

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Edita Poláchová

OPTIMALIZACE EXPRESNÍHO SYSTÉMU HEK293
BUNĚČNÉ LINIE POMOCÍ REGULACE BUNĚČNÉHO CYKLU
A APOPTÓZY

Optimization of HEK293 cell line expression system
by regulation of cell cycle and apoptosis

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.

Praha 2014

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli **RNDr. Ondřeji Vaňkovi, PhD.** za odborné vedení mé práce, trpělivost a snahu mě naučit novým dovednostem. Dále děkuji všem členům Katedry biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze za vytvoření příjemné pracovní atmosféry a ochotu vždy pomoci a poradit. V neposlední řadě děkuji mé rodině a přátelům za jejich velkou trpělivost, neustálou pomoc a podporu v době mého studia.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 18. 8. 2014

.....
Bc. Edita Poláchová

Abstrakt

Tranzientní transfekce savčích buněčných linií je známa jako užitečná technika pro přípravu rekombinantních proteinů, kterou lze získat miligramy až gramy proteinů za pouhé dva týdny od klonování odpovídající cDNA. Takto připravené nativní glykosylované proteiny mohou být využity pro různé účely v molekulární biologii, imunologii či farmaceutickém průmyslu, např. pro počáteční fáze preklinického výzkumu terapeutických proteinů. Jednou z nejvíce používaných hostitelských savčích buněčných linií je v tomto ohledu linie lidských embryonálních ledvinných buněk, kterou lze dobře kultivovat a snadno se chemicky transfekuje. Produkce proteinů v tranzientně transfekovaných lidských embryonálních ledvinných buňkách může být zvýšena celou řadou faktorů, např. koexpresí kyselého růstového faktoru fibroblastu či jeho přidavkem do kultivačního média, anebo koexpresí proteinů regulujících buněčný cyklus či apoptózu.

Byl připraven expresní plazmid pTW5, do kterého byl následně vložen gen pro aFGF, regulátor buněčného cyklu p18, p21 či p27 (inhibitory cyklin-dependentních kináz) nebo inhibitor apoptózy bcl-2 či bcl-x. Tyto plazmidy byly využity k optimalizaci expresního systému buněčné linie HEK293T. Za pomoci modelových proteinů – zeleného fluorescenčního proteinu a sekretované alkalické fosfatázy – byl sledován vliv těchto regulátorů exprese jak jednotlivě, tak v kombinaci, včetně dosud nepopsaného současného působení regulátorů buněčného cyklu a apoptózy. Dále byly optimalizovány celkové podmínky kultivace buněčné linie během produkce.

(Práce je psaná v českém jazyce.)

Klíčová slova

buněčný cyklus, inhibitor cyklin-dependentní kinázy, apoptóza, bcl, řízená proliferace, růstový faktor, HEK293, rekombinantní exprese, tranzientní transfekce, PEI

Abstract

Transient transfection of mammalian cell lines is an effective approach for recombinant protein production, which can provide milligrams to grams of proteins in two weeks from cloning of the corresponding cDNA. Native glycosylated proteins prepared via this approach can be used for various purposes in molecular biology, immunology or pharmaceutical industry, i.e. initial phase of pre-clinical therapeutic protein research. One of the most used mammalian host cell lines is the human embryonic kidney cell line, that can be easily cultivated and chemically transfected. The amount of proteins produced by transiently transfected human embryonic kidney cells can be enhanced by a whole range of factors, i.e. co-expression or direct addition of acidic fibroblast growth factor to the culture medium, co-expression of cell cycle regulating proteins or anti-apoptotic proteins.

Expression plasmid pTW5 was prepared and further modified by gene insertion of aFGF, cell cycle regulator p18, p21 or p27 (cyclin-dependent kinase inhibitors) or apoptosis inhibitor bcl-2 or bcl-x. These plasmids were then used for optimization of HEK293T cell line expression system. The impact of every single regulator and their combinations, including hitherto undescribed effect of combination of cell cycle regulator and anti-apoptotic protein, was monitored via model proteins – green fluorescent protein and secreted alkaline phosphatase. Furthermore, the general conditions of cell line cultivation during protein production were optimized.

(The thesis is written in Czech.)

Keywords

cell cycle, cyclin-dependent kinase inhibitor, apoptosis, bcl, controlled proliferation, growth factor, HEK293, recombinant expression, transient transfection, PEI

Seznam zkratek

aFGF	kyselý růstový faktor fibroblastu (acidic fibroblast growth factor)
APAF1	apoptotický faktor 1 aktivující proteázu (apoptotic protease-activating factor 1)
Bcl-2	rodina proteinů B buněk lymfatické leukémie (B cell lymphoma leukemia)
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
CDK	cyklin-dependentní kináza (cyclin-dependent kinase)
CHO	linie z buněk vaječníku křečička čínského (Chinese hamster ovary)
CMV	cytomegalovirus
DISC	smrt navozující signální komplex (death-inducing signaling complex)
DMSO	dimethylsulfoxid (dimethyl sulfoxide)
DNMT	DNA methyltransferáza (DNA methyltransferase)
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát (deoxyribonucleotide triphosphate)
dpt	dny po transfekci
EBNA1	jaderný antigen 1 viru Epstein–Baarové (Epstein–Baar nuclear antigen 1)
FACS	metoda třídění buněk pomocí fluorescence (fluorescence-activated cell sorting)
FADD	protein domény smrti asociované s Fas (Fas-associated death domain)
FSC	přímý rozptyl světla (forward scatter); plocha – FSC-A, výška – FSC-H
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
HDAC	histonová deacetyláza (histone deacetylase)
HEK	linie z lidských embryonálních ledvinových buněk (Human embryonic kidney)
IAP	rodina inhibitorů apoptotických proteinů (inhibitors of apoptosis proteins)
IPEI	lineární polyethylenimin (linear polyethylenimine)
MAC	mitochondriální kanál navozující apoptózu (mitochondrial apoptosis-induced channel)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PEI	polyethylenimin (polyethylenimine)
PI	propidium jodid (propidium iodide)
pNPP	para-nitrofenylfosfát (para-nitrophenyl phosphate)
Rb	tumor supresorový retinoblastomový protein (retinoblastoma)
RPM	otáčky za minutu (revolutions per minute)

SEAP	sekretovaná alkalická fosfatáza (secreted alkaline phosphatase)
SMAC	sekundární aktivátory kaspáz odvozené od mitochondrií (second mitochondria-derived activators of caspases)
SSC	boční rozptyl světla (side scatter); plocha – SSC-A, výška – SSC-H
SV40 TAg	velký T-antigen opičího polyomaviru 40 (simian vacuolating virus 40 T-antigen)
TNF	rodina receptorů faktoru nádorové nekrózy (tumor necrosis factor)
TRADD	protein domény smrti asociované s TNF receptory (tumor necrosis factor receptor-associated death domain)
WPRE	posttranskripční regulační sekvence viru hepatitidy B sviště lesního (woodchuck post-transcriptional regulatory element)

Obsah

1	Teoretický úvod.....	10
1.1	Linie lidských embryonálních ledvinných buněk.....	10
1.2	Tranzientní vs. stabilní exprese genu	11
1.3	Modifikace vektoru	12
1.4	Buněčný cyklus a proliferace buněk.....	12
1.4.1	Regulace buněčného cyklu.....	15
1.5	Apoptóza a vliv antiapoptotických faktorů na expresi proteinů	18
1.6	Reportérové proteiny.....	21
1.6.1	Zelený fluorescenční protein a průtoková cytometrie.....	21
1.6.2	Sekretovaná alkalická fosfatáza	23
2	Cíle práce.....	24
3	Materiál.....	25
3.1	Přístroje a pomůcky.....	25
3.2	Chemikálie	27
3.2.1	Enzymy	28
3.2.2	Bakteriální kmeny a buněčné linie	28
3.2.3	Expresní média pro tkáňové kultury	28
3.2.4	Plazmidy	28
3.2.5	Primery pro PCR	29
3.2.6	Připravené roztoky a směsi	29
4	Metody.....	31
4.1	Příprava reportérových vektorů pTW5-GFP a pTW5-SEAP	31
4.1.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR) k amplifikaci fragmentů DNA	31
4.1.2	Agarózová elektroforéza	32
4.1.3	Izolace z gelu pomocí kitu	32
4.1.4	Restrikce inzertů a linearizace plazmidu	32
4.1.5	Ligace inzertu do vektoru.....	33
4.1.6	Transformace plazmidu do kompetentních buněk tepelným šokem	33
4.1.7	PCR z kolonií a výběr pozitivních kolonií	34
4.1.8	Izolace plazmidové DNA pomocí kitu.....	34
4.1.9	DNA sekvenování	35
4.2	Příprava zásobních roztoků plazmidů	35

4.2.1	Transformace buněk plazmidovou DNA a její produkce	35
4.2.2	Izolace plazmidové DNA a její velkoobjemová příprava	36
4.3	Kultivace a uchovávání buněčné linie HEK293T	36
4.3.1	Určení buněčné hustoty a viability použitím hemocytometru	36
4.3.2	Příprava mrazicího a kultivačního média	37
4.3.3	Zmrazování a rozmrazování buněčné linie HEK293T	37
4.3.4	Kultivace HEK293T buněčné linie	38
4.4	Tranzientní transfekce HEK293T buněčné linie.....	38
4.4.1	Příprava kultivované buněčné suspenze pro transfekci.....	38
4.4.2	Příprava transfekční směsi plazmidové DNA a IPEI	39
4.5	Stanovení a vyhodnocení reportérových proteinů	39
4.5.1	Stanovení úspěšnosti transfekce měřením fluorescence GFP	39
4.5.2	Stanovení výtěžku exprese měřením enzymové aktivity SEAP	40
5	Výsledky.....	41
5.1.1	Příprava reportérových plazmidů pTW5-GFP a pTW5-SEAP.....	41
5.1.2	Příprava zásobních roztoků všech plazmidů používaných pro tranzientní transfekci HEK293T buněčné linie.....	42
5.1.3	Optimalizace poměru DNA : IPEI v transfekční směsi a porovnání vlivu pTT5 a pTW5 vektorů na expresní systém HEK293T buněk	44
5.1.4	Transfekce buněk HEK293T regulačními geny za účelem optimalizace použité kultivační nádoby a buněčné hustoty	47
5.1.5	Optimalizace poměru jednotlivých regulačních plazmidů vůči celkovému obsahu DNA v transfekční směsi.....	50
5.1.6	Optimalizace poměru regulačních plazmidů ve vzájemné kombinaci vůči celkovému obsahu DNA v transfekční směsi	53
6	Diskuze	57
7	Shrnutí.....	62
8	Seznam použité literatury	63

1 Teoretický úvod

Lidský organismus obsahuje geny, DNA sekvence, které jsou reprezentovány příslušnými proteiny [1]. Pokud nějaký gen zmutuje, mění se tím primární struktura vyráběného proteinu, což může zapříčinit onemocnění organismu. Výroba proteinových léčiv pro terapii je proto velmi důležitým odvětvím pro farmaceutický průmysl. Potřebný protein je možné izolovat z člověku biologicky příbuzných zvířat, avšak mezidruhovému rozdílu se mohou odrazit v jiné struktuře proteinu, což může vyústit v alergii či odlišnou biologickou funkci proteinu [2–4]. Rekombinantní proteiny neboli proteiny vyráběné hostitelským organismem, do něž byla vložena cizorodá DNA, proto mají velký význam ve farmaceutickém odvětví, neboť mohou být vyráběny ve vhodném hostitelském organismu, který zajistí správnou terciární strukturu proteinu i jeho posttranslační modifikace [3–6].

1.1 Linie lidských embryonálních ledvinných buněk

Pro přípravu lidských rekombinantních proteinů jsou často využívány savčí buněčné linie. Tyto buňky jsou pro lidské geny velmi kompatibilní a zajišťují obvykle potřebné posttranslační modifikace syntetizovaného proteinu [5–8]. Savčí buněčné linie se obvykle kultivují při 37 °C v 5% CO₂ atmosféře v médiích, která obsahují potřebné živiny a případná aditiva, např. antibiotika, zamezující kontaminaci buněčné linie.

Pro expresi lidských genů je využíváno mnoho savčích buněčných linií, např. nejpoužívanější a nejstarší buněčná linie HeLa, která byla odvozena od rakovinných buněk děložního čípku Henrietty Lacksové, buněčná linie odvozená od vaječnickových buněk křečička čínského (CHO, z angl. Chinese hamster ovary), či buněčná linie odvozená od lidských embryonálních ledvinných buněk (HEK293, z angl. human embryonic kidney). Tato buněčná linie je populární především pro svou krátkou generační dobu 24 h, malou velikost buněk, vysokou úspěšnost transfekce a následnou produkci proteinu [9].

Nizozemský vědec Alex van der Eb v Leidenu roku 1970 kultivoval lidské embryonální ledvinné buňky zdravého a legálně potráceného plodu [10] a Frank Graham tyto buňky následně transformoval adenovirem typu 5 [11], čímž vznikla linie buněk HEK293. Číslo označuje 293. experiment, při kterém buňky vznikly [11]. Tato buněčná linie byla transfekována dalšími geny a také uzpůsobena pro suspenzní kultivaci, čímž vzniklo více variant této linie, například HEK293E, HEK293T a HEK293S.

HEK293E buněčná linie je stabilně transfekována jaderným antigenem 1 viru Epstein–Baarové (EBNA1, z angl. Epstein–Baar nuclear antigen 1), který umožňuje epizomální replikaci plazmidů, které obsahují replikační počátek oriP [12,13], čímž je až třikrát zvýšena specifická produktivita proteinu než v případě plazmidu bez oriP sekvenční [14]. Obdobně je tomu u buněčné linie HEK293-6E. Tato kultura je stabilně transfekovaná upravenou verzí genu EBNA1. Buněčná linie HEK293T stabilně exprimuje velký T-antigen opičího polyomaviru (SV40 TAg, z angl. simian vacuolating virus 40 T-antigen) a umožňuje tak epizomální replikaci plazmidů, které obsahují replikační počátek SV40 [12]. Buněčná linie HEK293S postrádá N-acetylglukosaminyltransferázu I, a proto jsou vyrobené proteiny homogenně N-glykosylovány. Používá se proto nejčastěji k přípravě proteinů pro strukturní výzkum, včetně syntézy membránových proteinů [15,16].

1.2 Tranzientní vs. stabilní exprese genu

Nejpoužívanější metoda produkce rekombinantních proteinů je stabilní transfekce savčích buněčných linií. Vytvoření stabilní buněčné linie, která vytváří kýžený protein, však vyžaduje velké množství času a laboratorní práce. Nabízí se tedy metoda tranzientní transfekce buněčných linií, díky které je možné získat protein již v řádu týdnů [4–6,14, 17–19]. Touto metodou je také do jisté míry možné vyřešit problém výroby proteinů, které jsou pro hostitelské buňky cytotoxické či cytostatické a není tedy možné tyto proteiny vyrábět pomocí stabilní exprese [18]. Avšak důvodem, proč není tranzientní transfekce tolik využívána, je nízký výtěžek proteinů a nízká specifická produktivita buněk, které jsou řádově nižší než v případě stabilní genové exprese [20,21]. Tranzientně transfekované adherentní savčí buňky mohou produkovat velká množství rekombinantních proteinů, avšak tato metoda je limitována právě velikostí povrchu a tudíž i počtem buněk.

Aby mohla být tranzientní transfekce plnohodnotným soupeřem stabilní genové expresi, byly navrženy a testovány různé strategie na zvýšení výtěžku a specifické produktivity suspenzně kultivovaných savčích buněčných linií. Mezi tyto strategie patří například vysokohustotní transfekce buněčné linie [14,22], upravení vektoru, kterým je buněčná linie transfekována [14,17,18], řízení buněčného cyklu hostitelských buněk koexpresí dalších genů [18], řízení proliferace a apoptózy hostitelských buněk koexpresí dalších genů [17,23,24], přidavky chemikálií do kultivačních médií jako například růstové hormony [17] a jiné chemické látky ovlivňující buněčný cyklus hostitelských buněk či jiným způsobem zvyšující specifickou produktivitu, například butyrát sodný [25] či kyselina valproová [17,18,26,27].

Transfekce hostitelských buněk zprostředkovaná polymery, konkrétně polyethyleniminem (PEI), je obecně velmi užívanou a rozšířenou metodou pro tranzientní genovou expresi [14,17,18,22,24,28]. Používané pracovní koncentrace PEI jsou relativně nízké, čímž jej dělají levným, účinným a téměř netoxickým prostředkem k vložení plazmidové DNA do savčích buněčných linií [18,29]. Navíc je PEI vysoce kompatibilní pro práci s bezsérovými buněčnými suspenzemi [19,30].

1.3 Modifikace vektoru

Vektory jsou plazmidy, kruhové DNA, které jsou navrženy k expresi kýžených proteinů. Mají za úkol doručit DNA do hostitelské buňky a využít její proteosyntetický aparát k výrobě tohoto proteinu. Díky pokroku v rozvoji klonovacích metod, jakými jsou polymerázová řetězová reakce, sekvenace DNA a využití restrikčních endonukleáz je dnes možné vytvořit dostatečné množství rekombinantní DNA v relativně krátkém čase.

Vložením některých dalších DNA sekvencí do vektoru lze zvýšit specifickou produktivitu tranzientně transfekovaných buněčných linií [14,18,31]. Mezi takové geny lze zařadit například:

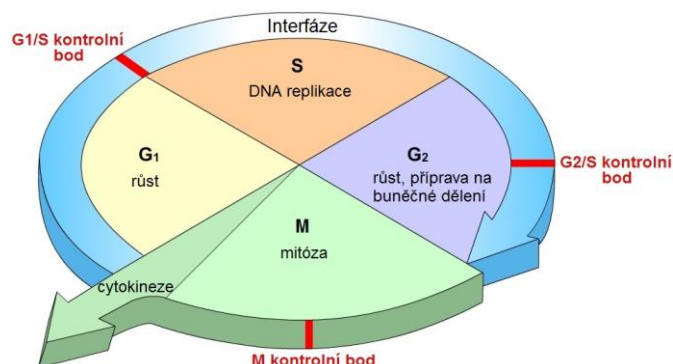
- promotor lidského cytomegaloviru (CMV), který zvyšuje expresi genu vloženého do buněk HEK293, ve kterých je trans-aktivován expresí proteinu adenoviru E1a [32,33]
- posttranskripční regulační sekvenci (WPRE, za angl. woodchuck post-transcriptional regulatory element), která zvyšuje stabilitu vzniklé mRNA [34,35]
- sekvenci Kozakové, která zajišťuje translaci DNA na ribosomech [36,37]
- polyadenylační signál, který ukončuje transkripci genu

Kombinací jednotlivých sekvencí v jednom vektoru, např. CMV promotoru, WPRE sekvence a sekvence Kozakové, lze dosáhnout velkého zvýšení exprese genu [18].

1.4 Buněčný cyklus a proliferace buněk

Buněčný cyklus se skládá z dvou hlavních fází a jejich několika dalších fází, které vedou k rozdělení buňky, případně k její diferenciaci (Obr. 1.1, str. 13). Během první fáze – interfáze – buňka roste a replikuje svou genetickou informaci, čímž se připravuje se na vstup do druhé – mitotické – M fáze, během které dochází k rozdělení buňky na dvě buňky dceřiné. Proliferace buněk je řízena několika kontrolními body, které inhibují či aktivují cyklin-dependentní kinázy, které umožňují vstup buňky z jedné fáze do druhé [38].

Tyto kontrolní body zajišťují, že se neobjevila žádná buněčná či genetická poškození, která by vedla k neřízenému, malignímu bujení, a že veškeré procesy, které jsou nezbytné pro správné dělení buňky, jsou kompletní [39].



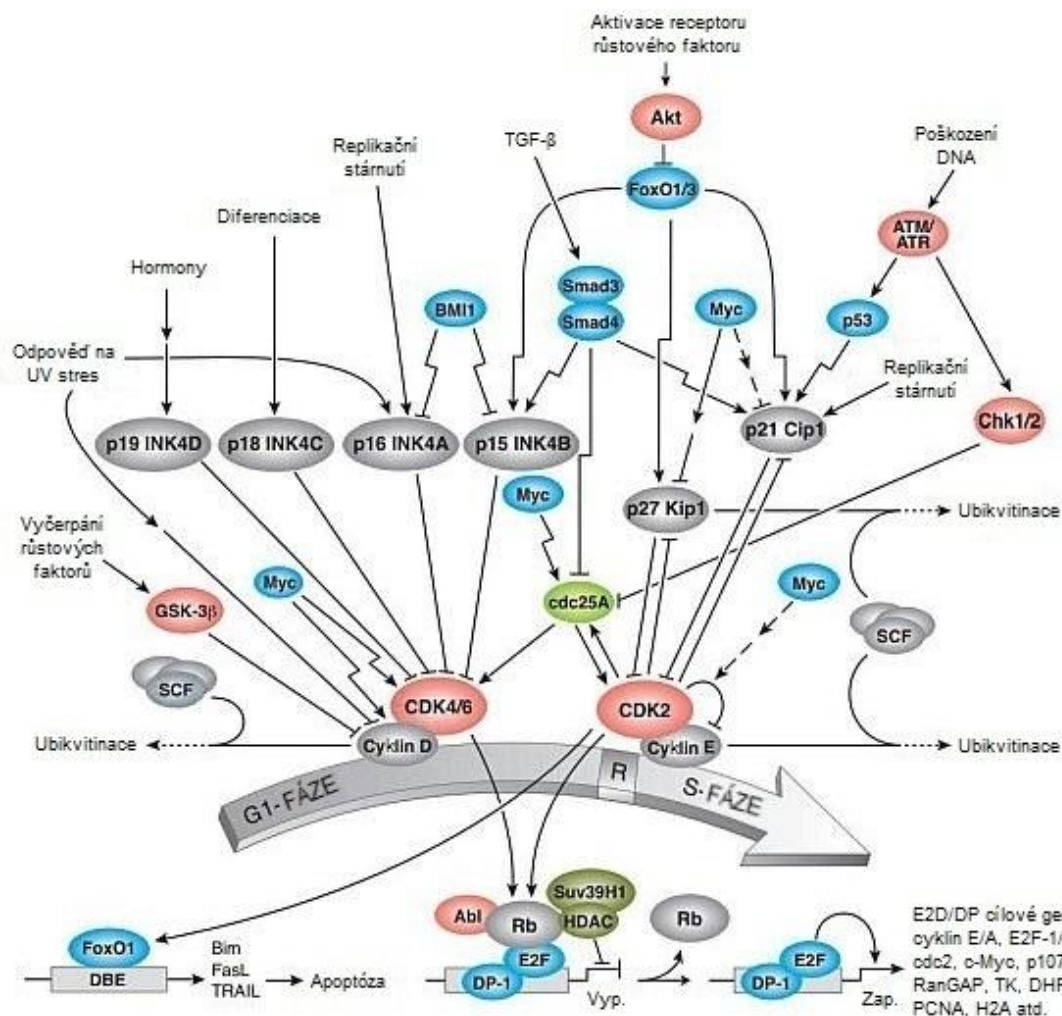
Obr. 1.1: Schéma buněčného cyklu eukaryotní buňky.

Buněčný cyklus připravuje buňku během interfáze na mitotické dělení během M fáze, končící cytokinezí. Interfázi můžeme dále dělit na fáze G_1 , S a G_2 . Převzato a upraveno podle [40].

Interfáze sestává z tří dalších fází – G_1 fáze, S fáze a G_2 fáze. Během syntetické S fáze je genetický materiál buňky replikován, aby mohl být následně rozdělen do dvou dceřiných buněk, jsou syntetizovány histony, aby mohly být tvořeny nukleozomy a následně chromatinové vlákno [41,42]. Této fázi předchází G_1 fáze, během které probíhají procesy umožňující replikaci DNA buňky – syntetizují se nukleotidy, DNA polymerázy a další enzymy nezbytné pro vytvoření replikované DNA. Na konci této fáze se nachází první kontrolní bod G_1/S (Obr. 1.2, str. 14). Během G_2 fáze, která následuje po S fázi a předchází mitotické M fázi, dochází k syntéze proteinů nezbytných pro kondenzaci chromatinu, vytvoření mitotického aparátu a buňka je tak připravena se rozdělit [41,42]. Na konci této fáze se nachází druhý kontrolní uzel G_2/M .

Kontrolní body sestávají z několika mechanismů zahrnující syntézu cyklinů, aktivaci cyklin-dependentních kináz (CDK) fosforylací, interakci těchto kináz s CDK inhibitory a následně ubikvitinaci a proteolýzu cyklinů. CDK inhibitory regulují aktivitu CDK. Na počátku fáze dochází k syntéze cyklinu, který se váže na CDK, kterou následně může aktivovat fosforylací aktivační CDK [43,44]. Aktivované CDK deaktivují fosforylací tumor supresorový retinoblastomový protein (Rb), který je do té doby navázán na proteiny z rodiny E2F, tzv. transkripční faktory [45], které se při aktivaci, tedy po odštěpení Rb proteinu, váží na různá místa DNA a spouští tak replikaci DNA [46]. Inhibitory CDK se mohou vázat na CDK a zabránit jí tak ve vazbě s cyklinem. Byly rozlišeny dvě rodiny inhibitorů CDK, které se liší ve struktuře a mechanismu inhibice. Cip/Kip inhibitory,

například p21, p27 a p53, se váží na kinázu přes N-terminální doménu, čímž blokuji navázání cyklinu typu A, D a E na CDK 2, 4 a 6 [47]. Ink inhibitory, např. p15, p16, p18 a p19, se specificky váží na CDK 4 a 6 a zabráňují tak interakci s cyklinem typu D [48].



Obr. 1.2: Mechanismus regulace kontrolního bodu G₁/S v savčím buněčném cyklu.

Neúplně fosforylovaný Rb protein se váže na E2F–DP-1 komplex transkripčních faktorů a tvoří tak inhibiční komplex zabráňující transkripčním dějům, která je nezbytná pro postup buňky do S fáze. Komplexy CDK 4/6–cyklin D a CDK 2–cyklin E společně fosforylují Rb protein, který se následně disociuje od inhibičního komplexu s E2F–DP-1, tím umožní transkripci potřebných proteinů pro replikaci DNA v S fázi. Za přítomnosti růstových hormonů inhibuje Akt fosforylací FoxO1/3 komplexu, který podporuje tvorbu inhibitorů CDK. Pokud je však již růstových faktorů nedostatek, je aktivován GSK-3β, který fosforyluje cyklin D a tím umožní jeho ubiquitinaci prostřednictvím komplexu SCF a následně jeho rozpad v proteazomu. Poškození DNA, UV stres, diferenciacce buňky a další faktory taktéž ovlivňují kontrolní bod G₁/S, a to prostřednictvím transkripčních faktorů, které syntetizují inhibitory CDK – p15, p16, p18, p19, p21, p27. Ty zabráňují vzniku komplexů CDK 4/6–cyklin D a CDK 2–cyklin E. Cytokin TGF-β stimuluje tvorbu těchto inhibitorů CDK a dále také inhibuje transkripci cdc25A fosfatázy, která je nezbytná pro aktivaci CDK. Tím je umožněna degradaci cdc25A prostřednictvím ubiquitinačního komplexu SCF. Převzato a upraveno podle [49].

Během M fáze dochází k mitóze a cytokinezi, při které vznikají dvě dceřiné buňky, každá obsahující jednu kopii DNA mateřské buňky. Tyto dceřiné buňky opět začínají buněčný cyklus vstupem do interfáze. Po G_1 fázi však mohou buňky vstoupit do klidové G_0 fáze. V této fázi se buňky nedělí, neboť jsou odstraněny cykliny a CDK, a mohou být diferenciovány [50].

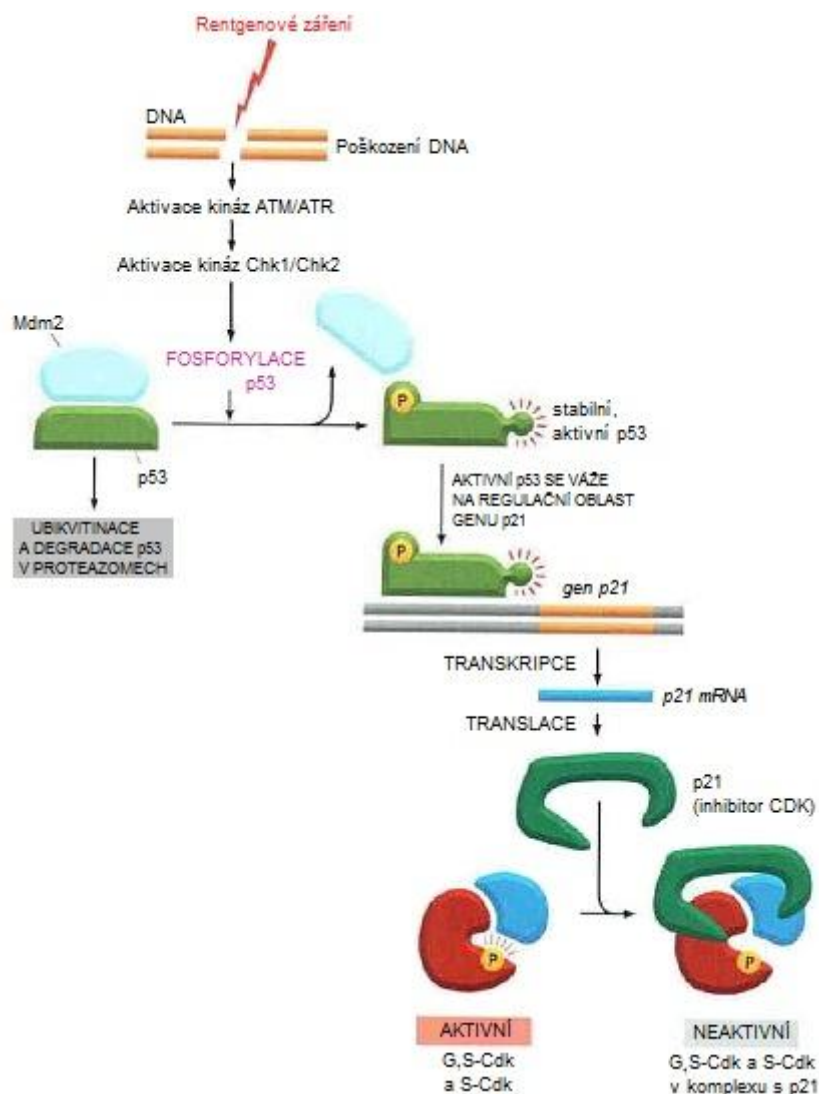
1.4.1 Regulace buněčného cyklu

Pro optimalizaci tranzientní exprese genu lze využít zadržení buňky v G_1 fázi [51]. Na konci této fáze je buňka větší, metabolicky více aktivní [52,53] a exprimuje více genů zodpovědných za syntézu ribozomů [54]. Zadržení v této fázi lze provést např. geneticky manipulací s inhibitory CDK, které deaktivují CDK, čímž aktivují Rb protein zodpovědný za inhibici replikace DNA. Buňka tak nemůže projít přes G_1/S kontrolní bod a zůstává polapena na konci G_1 fáze. Inhibitory CDK mají pozitivní vliv na expresi genu však pouze při koexpresi, pokud je buněčná linie stabilně transfekována inhibitory CDK, např. p21, buňky nevykazují žádné zvýšení exprese genů [55]. Koexprese CDK inhibitoru p53 vede ke zvýšení exprese p21, avšak zvýšená exprese p53 působí apoptoticky [56], zatímco p21 může být koexprimován přímo (Obr. 1.3, str. 16).

Zásahy do buněčného cyklu hostitelských buněk genetickými modifikacemi a změnami prostředí mohou u buněk vyvolávat oxidativní stres a poškození DNA, což může mít za následek snížení exprese genu. Řešením mohou být růstové faktory, které hrají hlavní roli v řízení proliferace a apoptózy embryonálních buněk [57].

Avšak ne všechny růstové faktory mají stejný vliv na genovou expresi [17]. Největší účinnost projevuje kyselý růstový faktor fibroblastu (aFGF), který může zvýšit specifickou produkci u HEK293E o 60 % a výtěžek exprese o 80 % [17]. Růstový faktor může být koexprimován spolu s kýženým proteinem, což značí jednoznačnou ekonomickou výhodu – není nutné přidávat protein růstového faktoru do kultivačního média, neboť si jej buňka stále vytváří [17].

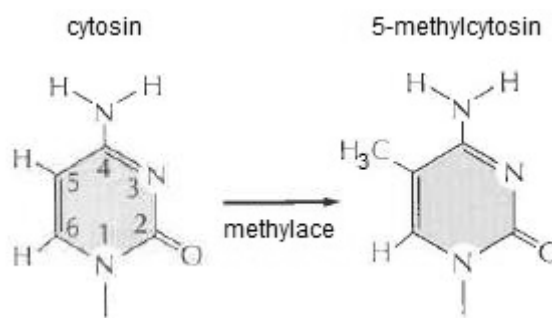
Kombinací růstových faktorů spolu s dalšími geny ovlivňujícími buněčný cyklus, např. inhibitory cyklin-dependentních kináz, lze zvýšit specifickou produktivitu tranzientně transfekovaných buněk až na úroveň srovnatelnou s výtěžky produkcí stabilních linií [18].



Obr. 1.3: Mechanismus zadržení buňky v G_1 fázi.

Při poškození DNA jsou aktivovány proteinkinázy ATM či ATR (podle druhu poškození). Následně jsou aktivovány dodatečně proteinkinázy Chk1 a Chk2, které fosforylují regulační protein p53. Fosforylace p53 zabraňuje navázání komplexu MDM2, který by tak umožnil ubikvitinaci p53 a následně jeho degradaci v proteazomu. Protein p53 se tak hromadí a stimuluje produkci inhibitoru CDK p21. Inhibitor p21 se následně váže na komplexy G_1/S -CDK a S-CDK, čímž je deaktivuje a zadrží tak buňku v G_1 fázi. Převzato a upraveno podle [58].

Specifická produktivita u tranzientní exprese může být snížena epigenetickými procesy, které tzv. umlčují transkripci DNA. Mezi takové procesy patří např. methylace DNA [59,60], během které DNA methyltransferáza (DNMT) přenáší methylovou skupinu z S-adenosylmethioninu u eukaryotních buněk na CpG místo [61], které je zodpovědné za expresi genu, konkrétně na pátý uhlík cytosinu (Obr. 1.4, str. 17) a vzniká tak C5-methylcytosin [51,61–63]. Kvůli této modifikaci cytosinu není možné přepsat tento úsek DNA do mRNA a je tak zabráněno expresi genu.

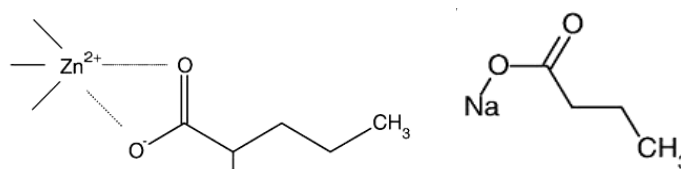


Obr. 1.4: Vznik C5-methylcytosinu.

DNA methyltransferáza m5C přenáší methylovou skupinu na C5 cytosinu, který se nachází v CG sekvenci dvoušroubovice DNA. Převzato a upraveno podle [64].

Mezi další epigenetické procesy ovlivňující expresi genu patří deacetylace histonů [65–67], během které je histonovou deacetylázou (HDAC) odebrán acetyl z lysinu na histonu, histon je tak více bazický a negativně nabitě vlákno DNA je tak pevněji vázáno na histon, což znemožňuje rozvolnění vlákna pro následnou transkripci DNA.

Aby bylo zabráněno negativnímu vlivu těchto epigenetických procesů, je možné využít některých chemických látek, které pracují jako inhibitory DNMT, např. azacytidin a RG108 [26], či inhibitory HDAC, mezi které patří například butyrát sodný [25], trichostatin a kyselina valproová [17,18,26,27]. Inhibitory DNMT a HDAC mají taktéž vliv na buněčný cyklus a apoptózu buněk [68,69] a vliv těchto dvou typů inhibitorů je synergický [69]. Nedostatečná aktivita HDAC1 zvyšuje expresi CDK inhibitorů p16, p21 a p27 [70,71]. Butyrát sodný pravděpodobně defosforyluje retinoblastomový protein [72] a kyselina valproová váže zinečnaté ionty (Obr. 1.5), které jsou nezbytné pro aktivitu HDAC [73] a histony tak zůstávají acetylované [74]. Lze proto tyto látky využít také jako chemické regulátory buněčného cyklu.



Obr. 1.5: Chemická struktura kyseliny valproové a butyrátu sodného.

Kyselina valproová (vlevo) váže zinečnatý iont, čímž inhibuje Zn-dependentní HDAC. Převzato z [75].

Další možností regulace buněčného cyklu je změna environmentálních podmínek při kultivaci. Savčí buňky jsou při teplotě 37 °C velmi viabilní a vysoce proliferují. Kultivování savčích buněk mimo jejich fyziologickou teplotu však vede ke změně strategie

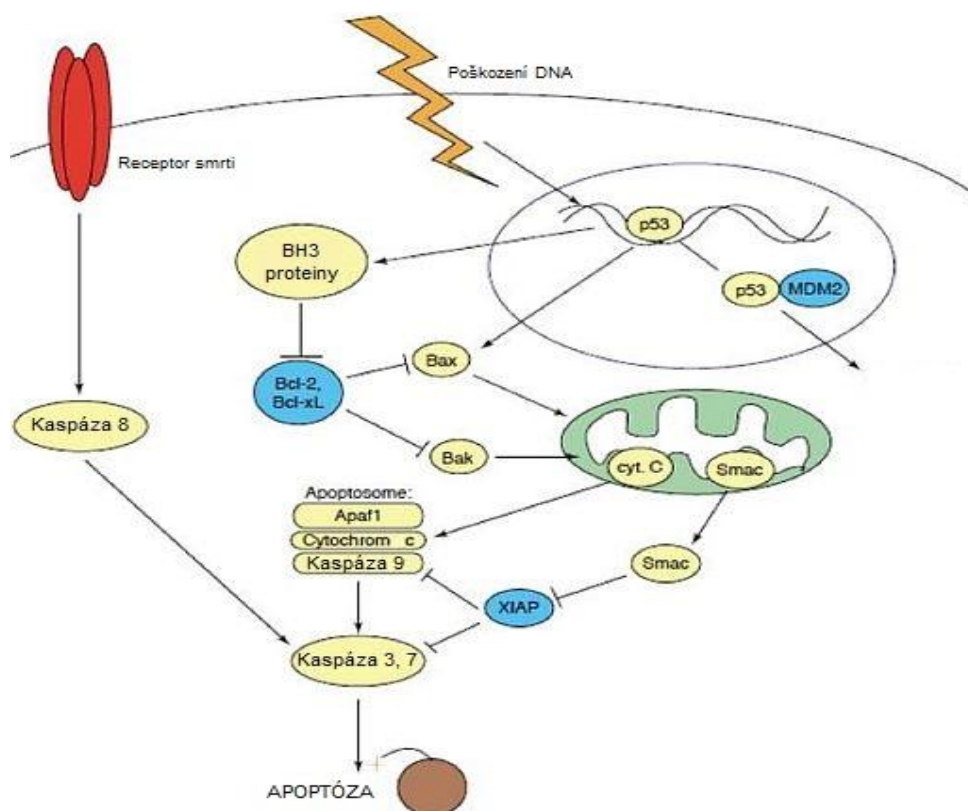
buňky na genetické a molekulární úrovni a dochází k výraznému poklesu proliferace. Při kultivaci buněk při lehce hypotermních podmínkách, tj. 30–35 °C, bylo pozorováno zpomalení růstu buněk především v G₁ a S fázi a zvýšení produkce rekombinantních proteinů [76]. Oproti tomu kultivace v extrémních hypotermických podmínkách, tj. 4 °C, vedla k úplnému zastavení metabolismu [77]. Během kultivace v mírných hypotermických podmínkách dochází také k prodloužení trvání kultury, neboť se zpomalením metabolismu ubývá celková spotřeba živin a produkce odpadních látek [78]. Dále dochází ke snížení citlivosti vůči proapoptotickým látkám a zvýšení citlivosti ke změnám pH buněčné kultury [79,80].

1.5 Apoptóza a vliv antiapoptotických faktorů na expresi proteinů

Jedním z negativních důsledků tranzientní transfekce bývá pórovitost cytoplazmatické membrány působením chemikálií používaných při transfekci [23] a dalších stresových faktorů, které mohou vést k předčasné buněčné smrti – apoptóze [81]. Apoptóza je geneticky řízený proces, pozorovatelný jako smrštění chromatinu a buňky samotné, doprovázené rozpadem cytoplazmatické membrány a vznikem apoptotických tělísek, která mohou být následně fagocytována [82,83]. Porozumění mechanismu apoptózy na molekulární úrovni tudíž může být jedním z řešení, jak zabránit předčasné smrti transfekovaných buněk a zvýšit tak viabilitu buněčné suspenze. Apoptóza je komplexní a sofistikovaný sled reakcí, při kterém dochází k aktivaci proteolytických enzymů – kaspáz – štěpících proteiny. Kaspázová kaskáda – sled reakcí, při kterém se kaspázy vzájemně postupně aktivují – sestává z iniciačních kaspáz 2, 8, 9 a 10, exekutorových kaspáz 3, 6 a 7 a zánětlivých kaspáz 1, 4 a 5 [84]. Dnes jsou rozlišovány dvě základní, vzájemně propojené, apoptotické dráhy [85] – vnější signální dráha transdukovaná receptory na povrchu buňky a vlastní signální dráha zprostředkovaná mitochondriemi (Obr. 1.6, str. 19).

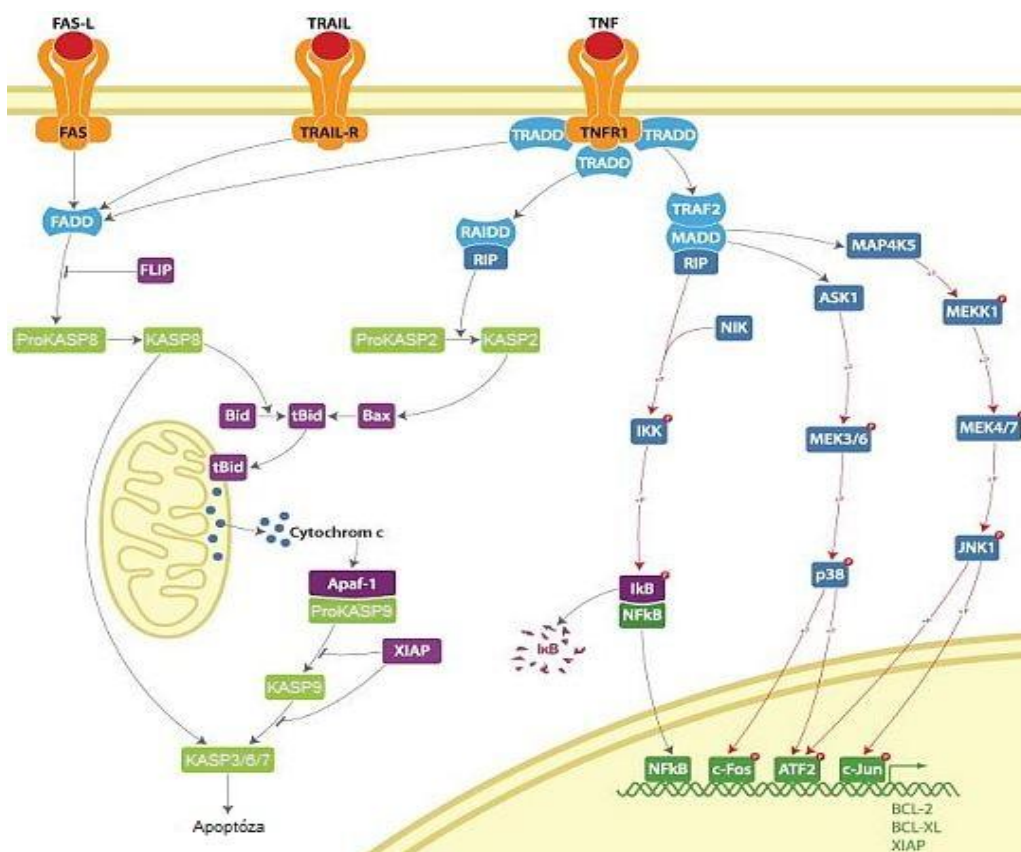
Vnější signální dráha apoptózy zahrnuje interakce transmembránových receptorů (Obr. 1.7, str. 20), mezi které patří tzv. „receptory smrti“ z rodiny receptorů faktoru nádorové nekrózy (TNF, z angl. tumor necrosis factor). Společným znakem pro tuto rodinu jsou extracelulární ligandy nesoucí tzv. „doménu smrti“, která se váže na daný receptor a umožní tak přenos „signálu smrti“ z povrchu buňky dovnitř [86]. Modelovým příkladem mechanismu vnější apoptotické dráhy je např. TNF- α /TNFR1 a FasL/FasR interakce, při které se TNF ligand váže na TNF receptor a Fas ligand na Fas receptor [87]. Po vazbě ligandu se na receptor váží adaptérové proteiny TRADD a FADD, které spolu dále

interagují a vytváří tzv. „smrt navozující signální komplex“ DISC, který aktivuje autokatalytické štěpení prokaspázy 8 vedoucí ke vzniku aktivního proteolytického enzymu kaspázy 8 [88]. Tato iniciační kaspáza spouští kaskádu reakcí aktivujících další kaspázy, na jejímž konci jsou exekutorové kaspázy 3 a 7 zodpovědné za rozpad buňky na apoptotická tělíska.



Obr. 1.6: Signální dráhy apoptózy.

Vnitřní signální dráha apoptózy může být zapříčiněna např. poškozením DNA, které následně způsobí fosforylaci proteinů MDM2 a p53, čímž dochází k inhibici MDM2 a p53 tak není ubiquitinován a degradován, ale hromaděn. p53 způsobuje sledem dalších reakcí aktivaci proapoptotických proteinů. Zásadním momentem je vypuštění cytochromu *c* z mitochondrie a navázáním se na APAF1 a prokaspázu 9, čímž vzniká komplex zvaný apoptozom obsahující nyní aktivovanou iniciační kaspázu 9. Ta potom aktivuje exekutorové kaspázy (např. kaspázu 3), které způsobí rozpad a smrt buňky. Vypuštění či zadržení cytochromu *c* je řízeno proteiny z rodiny Bcl-2. Antiapoptotické proteiny této rodiny, např. bcl-2 a bcl-x, mohou být inhibovány proteiny s BH3 doménou, čímž je jim znemožněno inhibovat proapoptotické proteiny této rodiny, např. Bax a Bak, které zprostředkovávají vypuštění cytochromu *c*. Iniciační a exekutorové kaspázy jsou dále blokovány proteiny IAP, např. XIAP. Tyto proteiny však mohou být degradovány prostřednictvím interakce s proapoptotickými proteiny SMAC, které jsou taktéž uvolňovány z mitochondrie společně s cytochromem *c*, a dochází tak k uvolnění cesty pro apoptotické děje. Vnější signální dráha apoptózy je spuštěna navázáním sekretovaného ligandu na receptor smrti na povrchu buňky, čímž dochází ke sledu reakcí aktivujících iniciační kaspázu 8. Ta poté aktivuje exekutorové kaspázy a dochází tak k apoptóze. Převzato a upraveno podle [89].



Obr. 1.7: FasL/FasR a TNF- α /TNFR1 vedoucí k apoptóze.

Vpravo je znázorněna ligace TNF- α a TNFR1, jejímž výsledkem je asociace s proteinem TRADD. Tento protein dále interaguje s FADD proteinem vznikajícím při ligaci FasL a FasR. Tyto proteiny se následně váží na prokaspázu 8. Ta je poté štěpena na aktivní kaspázu 8 a aktivuje tak další proteiny regulující propustnost mitochondriální membrány či exekutorové kaspázy vedoucí k apoptóze. Protein TRADD je dále zodpovědný za aktivaci prokaspázy 2 štěpením na kaspázu 2, která podporuje syntézu proapoptotických proteinů, např. Bax. Převzato a upraveno podle [90].

Naproti tomu vnitřní apoptotická dráha zahrnuje stresové podněty, které nepůsobí na TNF receptory, ale podílejí se na intracelulárních signálech, které způsobují změny prostupnosti vnitřní membrány mitochondrií. Mezi tyto stresové podněty patří např. absence určitých růstových faktorů a cytokinů, vedoucí k neschopnosti buňky potlačit procesy spouštějící apoptózu, či přítomnost různých toxinů, virů nebo volných radikálů, podporující apoptotickou kaskádu [81]. Při změně prostupnosti vnitřní membrány mitochondrií dochází k otevření mitochondriálních pórů, což vede ke ztrátě transmembránového potenciálu a vylití různých látek do cytozolu [91]. Mezi tyto látky patří sekundární mitochondriální aktivátory kaspáz (SMAC, z angl. second mitochondria-derived activators of caspases), které svým navázáním deaktivují inhibitory apoptotických proteinů (IAP, z angl. inhibitors of apoptosis proteins), které blokuji apoptotickou kaskádu [92].

Dále může do cytozolu procházet cytochrom *c*, a to prostřednictvím kanálu MAC ve vnější mitochondriální membráně, jehož průchodnost řídí proteiny z rodiny Bcl-2 (Obr. 1.6, str. 19). Zatímco proapoptotické proteiny Bax a Bak jeho formaci umožňují, antiapoptotické proteiny bcl-2 a bcl-x formaci inhibují [93]. Tumor supresorový protein p53 hraje zásadní roli v regulaci proteinů rodiny Bcl-2, ačkoliv mechanismus této regulace nebyl dosud zcela objasněn [56,94]. Cytochrom *c* se za spotřeby adenosintrifosfátu váže na apoptotický faktor aktivující proteázu APAF1 a následně prokaspázu 9, čímž dochází ke vzniku apoptozomu. Apoptozom poté štěpí neaktivní prokaspázu 9 na její aktivní formu – kaspázu 3 [95].

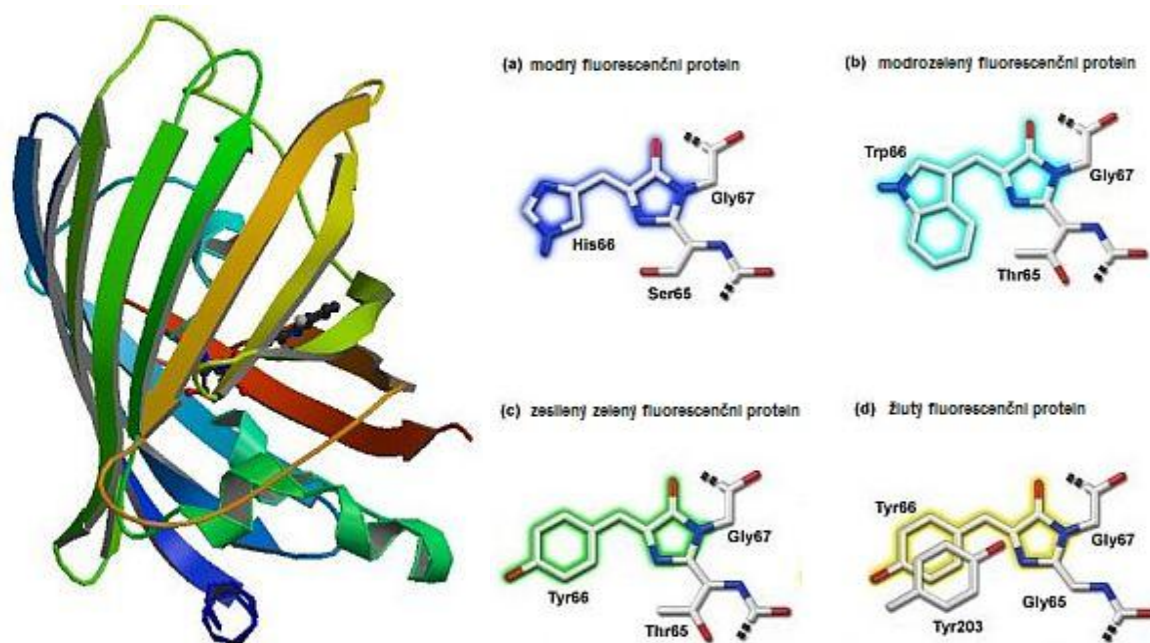
Inhibice apoptózy genetickými prostředky [96], např. expresí genů potenciálních antiapoptotických proteinů rodiny Bcl-2, tak může zvyšovat viabilitu buněčné suspenze [23,93,97]. Mimoto však bylo pozorováno, že jeden z členů této rodiny, protein bcl-x, je taktéž zodpovědný za zvýšení produkce specifického rekombinantního proteinu [98,99], zatímco ostatní členy rodiny, např. bcl-2, tuto schopnost postrádají [99,100]. Tato vlastnost tak činí antiapoptotický protein bcl-x jedinečným pro zkoumání vlivu na tranzientní genovou expresi. Bylo pozorováno zvýšení a zachování viability nad 88 % u buněčné linie stabilně transfekované genem bcl-x, zatímco netransfekované linii postupně klesala viabilita pod 60 % [24,98]. Transfekovaná linie taktéž vykazovala zvýšení produkce rekombinantního proteinu, jehož genem byla linie transfekována tranzientně [24,98]. V současnosti však neexistují žádné publikace, které by potvrzovaly zvýšení produkce rekombinantních proteinů buněčnou suspenzí transfekovanou antiapoptotickým genem tranzientně.

1.6 Reportérové proteiny

1.6.1 Zelený fluorescenční protein a průtoková cytometrie

Mezi často používané reportérové proteiny v molekulární biologii patří zelený fluorescenční protein (GFP, z angl green fluorescent protein), který byl objeven Osamou Shimomurou [101] při studiu bioluminiscence mořských organismů a byl poprvé izolován z medúzy *Aequorea victoria* [102]. Tento protein získal své jméno podle zelené barvy světla (maximum 509 nm), které emituje, je-li vystaven modrému až ultrafialovému světlu (maxima 395 nm a 475 nm) [103]. GFP je proto hojně používaným markerem pro genovou expresi a lokalizaci genových produktů. Fluorescenční vlastnost proteinu zajišťuje jeho chromofor, který vzniká spontánní cyklizací a oxidací postranních řetězců 65.–67. aminokyseliny, konkrétně -Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷-, případně -Thr⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷.

Pro fluorescenci je však kromě chromoforu vyžadováno i správné sbalení proteinu [104]. GFP obsahuje 238 aminokyselin, které vytvářejí 11 skládaných β -listů stočených do β -soudku. Středem tohoto soudku pak prochází 6 koaxiálních α -helixů, které kovalentně váží chromofor (Obr. 1.8). Mutagenézí aminokyselin v chromoforu (Obr. 1.8) lze dosáhnout emise fluorescence o jiné vlnové délce [104].



Obr. 1.8: Struktura GFP proteinu, aminokyselinová sekvence chromoforu GFP a jeho dalších modifikací.

Struktura β -soudku z 11 skládaných β -listů a 6 koaxiálních α -helixů (vlevo), v jehož středu se nachází chromofor, který vzniká cyklizací a oxidací postranních řetězců 65., 66. a 67. aminokyselin. Modifikací těchto aminokyselin je možné vytvořit další fluorescenční proteiny, neboť dochází k posunu vlnové délky emitovaného světla (vpravo): (a) záměna Tyr⁶⁶ za His⁶⁶ vytváří modrý fluorescenční protein, (b) záměna Tyr⁶⁶ za Trp⁶⁶ vytváří modrozelený fluorescenční protein, (c) záměna Ser⁶⁵ za Thr⁶⁵ vytváří „zesílený“ zelený fluorescenční protein, (d) naskládáním Tyr²⁰³ na Tyr⁶⁶ vzniká žlutý fluorescenční protein. Převzato a upraveno podle [105,106].

Úspěšnost transfekce tak lze stanovit právě prostřednictvím GFP, jehož fluorescence je měřena průtokovou cytometrií, konkrétně jejím specializovaným typem – třídění buněk pomocí fluorescence (FACS, z angl. fluorescence-activated cell sorting). FACS umožňuje rychlé, objektivní a kvantitativní třídění heterogenní směsi biologického materiálu na základě rozptylu světla a fluorescenčních vlastností jednotlivých buněk [107]. Směs buněk je strhávána do středu úzkého tekoucího proudu tak, aby byly jednotlivé buňky dostatečně separovány vzhledem k jejich velikosti [108]. Tento proud je

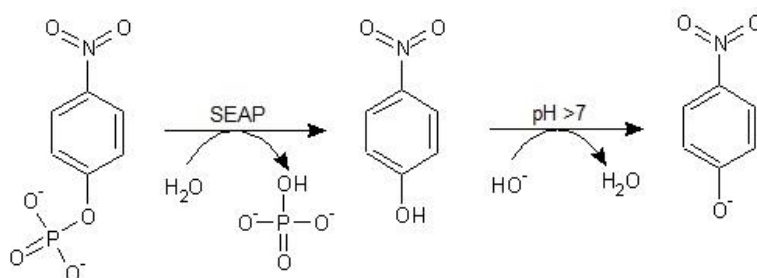
ozařován laserem a jsou tak měřeny fluorescenční vlastnosti suspenze, zaznamenávané na jednotlivých detektorech [107]. Následně je proud suspenze rozdělován vibračním mechanismem na jednotlivé kapičky tak, aby každá kapička obsahovala pokud možno pouze jednu buňku. Současně s jejich vznikem jsou jednotlivé kapičky nabity a rozděleny do jednotlivých kontejnerů právě na základě jejich elektrického náboje [108].

Pomocí FACS lze současně měřit i viabilitu buněk za použití interkalátorů DNA, např. propidium jodidu (PI). PI se vmezeřuje do dvouvláknových nukleových kyselin a při excitaci (maximum 535 nm) emituje červené světlo (maximum při 617 nm). PI však neprostupuje buněčnou membránou a může tak interagovat pouze s DNA v buňkách poškozených či mrtvých, jejichž buněčná membrána ztratila integritu [109].

1.6.2 Sekretovaná alkalická fosfatáza

Jako další reportérový protein můžeme použít sekretovanou alkalickou fosfatázu (SEAP, z angl. secreted alkaline phosphatase), jejímž stanovením můžeme měřit výtěžek exprese proteinu [110–112]. SEAP je modifikovaná lidská placentární alkalická fosfatáza, která byla zbavena membránové kotvy odstříhnutím posledních 24 aminokyselin na C-konci [110]. SEAP je proto buňkami sekretována do transfekčního média. Exprese SEAP je pozorovatelná již 24 h po transfekci a její kolorimetrické stanovení je až 10krát citlivější, než obdobné metody, např. měření chemiluminiscence luciferázy jakožto reportérového proteinu [112].

Stanovení je prováděno prostřednictvím supernatantu transfekované kultury, ke kterému je přidán para-nitrofenylfosfát (pNPP), ze kterého je při zásaditém pH odštěpen fosfát prostřednictvím SEAP a vzniká tak žlutý para-nitrofenol (Obr. 1.9) [113]. Množství vzniklého para-nitrofenolu, které lze spektrofotometricky stanovit při 405–410 nm, je přímo úměrné množství SEAP ve vzorku. Stanovení SEAP lze tedy měřit prostřednictvím její aktivity – změny absorbance při 410 nm v čase.



Obr. 1.9: Štěpení para-nitrofenylfosfátu prostřednictvím SEAP.

SEAP v zásaditém prostředí odštěpuje fosfát z para-nitrofenylfosfátu za vzniku tak žlutý para-nitrofenolátu.

2 Cíle práce

- příprava zásobních roztoků šesti expresních vektorů obsahujících regulátor buněčného cyklu (plazmidy pTW5-p18, pTW5-p21, pTW5-p27), růstový faktor (plazmid pTW5-aFGF) či inhibitor apoptózy (plazmid pTW5-bcl2, pTW5-bclx) a kontrolního prázdného vektoru pTT5
- příprava dvou reportérových vektorů obsahujících modelový protein (plazmidy pTW5-GFP, pTW5-SEAP) a následná příprava zásobních roztoků těchto vektorů
- optimalizace celkových podmínek kultivace buněčné linie HEK293T během produkce modelových proteinů SEAP a GFP a množství lineárního PEI a DNA pro transfekci
- optimalizace produkce modelových proteinů SEAP a GFP s využitím koexprese jednotlivých regulačních proteinů p18, p21, p27, aFGF, bcl-2, bcl-x
- optimalizace produkce modelových proteinů SEAP a GFP využitím koexprese regulačních proteinů p18, p21, p27, aFGF, bcl-2, bcl-x ve vzájemných kombinacích

3 Materiál

3.1 Přístroje a pomůcky

12- a 24jamkové destičky	Corning, Německo
96jamkové destičky s plochým/kulatým dnem	Corning, Německo
adhezivní podložka Sticky Pad	New Brunswick Scientific, USA
analytické váhy	AND, USA
autokláv Varioklav 300/400/500 EP-Z H+P	Labortechnik GmbH, Německo
centrifuga Allegra X-22R	Beckman Coulter, USA
centrifuga EBA 12 R	Hettich, Německo
centrifuga Universal 320R	Hettich, Německo
centrifugační PP zkumavky s prodyšným víčkem	TPP, Německo
centrifugační PP zkumavky s víčkem	Corning, Německo
centrifugační PP zkumavky s víčkem	TPP, Německo
centrifugační PPCO kyvety Oak Ridge	Sigma–Aldrich, USA
centrifugační PPCO lahvičky NALGENE	P-LAB, ČR
filtry pro sterilizaci 0,22 µm	Corning, Německo
fotoaparát SP-500 UZ (6 MPix)	Olympus, Japonsko
hemocytometr	INCYTO, Korea
hrnaté láhve DURAN s prodyšným víčkem	P-LAB, ČR
inkubátor IR 1500	LABsystem Praha, ČR
inkubátor MCO-18AIC pro tkáňové kultury	Sanyo, Japonsko
inkubátor Orbi-Safe TS NetWise	Gallenkamp, Německo
kahan	Fuego SCS VERKON, ČR
kahan	závod Votice, ČR
kolonky High-Speed Plasmid Mini Kit	Geneaid, USA
kolonky JETquick Gel Extraction Spin Kit	Genomed, Německo
kolony NucleoBond Xtra Maxi	MACHEREY–NAGEL, Německo
kovový blokový termostat LS1	VLM, Německo
kryozkumavky	P-LAB, ČR
lednice 225 R (t = 4 °C)	Calex, ČR
mikrocentrifuga MiniStar silverline	VWR, USA
mikroskop inverzní AE 31	Intraco Micro, ČR
mrazicí box (t = -20 °C)	Calex, ČR

mrazicí box Ultra-low UDF-U53V ($t = -80\text{ }^{\circ}\text{C}$)	Sanyo, Japonsko
mrazicí kontejner Mr. Frosty	Sigma–Aldrich, USA
Petriho misky	Corning, Německo
pH metr ino Lab	Schoeller, Německo
pipetovací nástavec	Midiplus Biohit, USA
pipety automatické Discovery	HTL, Polsko
pipety automatické Pipetman	Gilson, USA
pipety osmikanálové	Eppendorf, ČR
pipety PP	Corning, Německo
průtokový cytometr BD LSR II	BD Biosciences, USA
předvážky KB1200-2	Kern, Německo
rotační vakuová odparka SpeedVac DNA 110	Savant, USA
souprava pro agarózovou elektroforézu	Biokeystone Co, USA
spektrofotometr DU-70	Beckman, USA
spektrofotometr NanoVue Plus	GE Healthcare, UK
spektrofotometrická čtečka Sunrise	Tecan, Švýcarsko
termocyklér 0,2 ml \times 25	Techne, UK
termocyklér 0,5 ml \times 20	Techne, UK
třepačka Multitron Cell pro tkáňové kultury	Infors HT, Švýcarsko
třepačka Orbit 1000	Labnet, USA
UV prosvěcovací lampa (312 nm)	UVItec, UK
UV prosvěcovací lampa (300 nm)	Ultra-Lum, USA
UV/Vis spektrofotometr UV2 Series	Unicam, UK
vařič	ETA, ČR
vodní lázeň	Memmert, Německo
vodní lázeň TW2	Julabo, Německo
vortexový mixér	VELP Scientifica, Itálie
zdroj deionizované vody	Milli Q Merck-Millipore, USA
zdroj napětí PS 251-2	Sigma–Aldrich, USA

3.2 Chemikálie

Veškeré použité chemikálie byly minimální čistoty p.a., není-li uvedeno jinak.

agar	Oxoid, UK
agaróza	Sigma–Aldrich, USA
ampicilin ($c = 100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Biotika, Slovensko
azid sodný	Serva, USA
BSA (100× koncentrovaný)	New England Biolabs, USA
Combi PPP Master Mix	Top-Bio, Česká republika
diethanolamin	Sigma–Aldrich, USA
dihydrogenfosforečnan draselný	Lach-Ner, ČR
dihydrogenfosforečnan sodný	Lach-Ner, ČR
dimethylsulfoxid	Sigma, USA
DNA marker 1 kb	New England Biolabs, USA
DNA marker 100 bp	New England Biolabs, USA
dNTP mix ($c = 10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)	Top-Bio, ČR
ethanol denaturovaný	Lach-Ner, ČR
fosforečnan sodný	Lach-Ner, ČR
glycerol	Lach-Ner, ČR
Good View	Ecoli, SK
High-Speed Plasmid Mini Kit	Geneaid, USA
hydrogenfosforečnan sodný	Lach-Ner, ČR
chlorid draselný	Lach-Ner, ČR
chlorid hořečnatý	Lach-Ner, ČR
chlorid sodný	Lach-Ner, ČR
isopropanol	Lach-Ner, ČR
JETquick Gel Extraction Spin Kit	Genomed, Německo
kvasničný extrakt	Imuna Pharm, ČR
kyselina ethylendiamintetraoctová	Jersey Lab Supply, USA
kyselina octová	Lach-Ner, ČR
L-glutamin	Sigma–Aldrich, USA
lineární polyethylenimin 25 kDa	Polysciences, USA
NEB1 pufr (10× koncentrovaný)	New England Biolabs, USA
NucleoBond Xtra Maxi kit	MACHEREY–NAGEL, Německo

para-nitrofenylfosfát	Sigma–Aldrich, USA
PCR voda	Top-Bio, ČR
Pluronic F-68	Sigma–Aldrich, USA
propidium jodid	Sigma–Aldrich, USA
pufr pro T4 DNA ligázu (10 mmol·l ⁻¹ ATP)	New England Biolabs, USA
síran hořečnatý (c = 100 mmol·l ⁻¹)	New England Biolabs, USA
ThermoPol reakční pufr (10× koncentrovaný)	New England Biolabs, USA
Tris	Roth, Německo
trypanová modř	Sigma–Aldrich, USA
trypton	Oxoid, UK

3.2.1 Enzymy

<i>Age</i> I	5 U·μl ⁻¹	New England Biolabs, USA
Deep Vent DNA polymeráza	2 U·μl ⁻¹	New England Biolabs, USA
<i>Kpn</i> I	10 U·μl ⁻¹	New England Biolabs, USA
T4 DNA ligáza	400 U·μl ⁻¹	New England Biolabs, USA

3.2.2 Bakteriální kmeny a buněčné linie

<i>Escherichia coli</i> kmen DH5α	Invitrogen, USA
HEK293T	Dr. A. R. Aricescu, Oxford, UK

3.2.3 Expresní média pro tkáňové kultury

ExCELL293 médium	Sigma–Aldrich, USA
<ul style="list-style-type: none"> přidán L-glutamin o výsledné koncentraci 4 mmol·l⁻¹ 	
FreeStyle F17 médium	Gibco Invitrogen, USA
<ul style="list-style-type: none"> přidán L-glutamin o výsledné koncentraci 4 mmol·l⁻¹ přidán Pluronic F-68 o výsledné koncentraci 0,1 % 	

3.2.4 Plazmidy

pTT5, pTTo-GFPq, pTTo3c-SSH	Dr. Y. Durocher, CNRC, Kanada [14]
pTW5, pTW5-aFGF, pTW5-bcl2, pTW5-bclx, pTW5-p18, pTW5-p21, pTW5-p27	E. Poláchová, PřF UK, ČR [114]

3.2.5 Primery pro PCR

GFP_FW

5' AAAAACCGGTGCTAGCAAAGGAGAAGAACTCTTC 3'

GFP_REV

5' TTTTGGTACCTCAGTTGTACAGTTCATCCATGCC 3'

pTT_FW

5' TGATATTCACCTGGCCCGATCTG 3'

pTW5seq_REV

5' AAGCAGCGTATCCACATAGCG 3'

SEAP_FW

5' AAAAACCGGTCTGCTGCTGCTGCTG 3'

SEAP_REV

5' TTTTGGTACCTCACTGTCCTCCATGGTGATG 3'

3.2.6 Připravené roztoky a směsi

LB agar

- 1,5% (w/v) agar v LB médiu, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ampicilin

LB médium

- 1% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 1% (w/v) NaCl; pH = 7,4
- sterilizováno v autoklávu

IPEI roztok (10× koncentrovaný)

- 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ IPEI v 150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; pH = 7,0
- sterilizováno filtrací přes 0,22 μm filtr, uchováno při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- před použitím zředěno PBS-TK na pracovní koncentraci 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

PBS-TK pufr

- 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na_2HPO_4 , 150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl, 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 ; pH = 7,0
- sterilizováno filtrací přes 0,22 μm filtr

PI roztok

- 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ PI, 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ NaN_3 v PBS-TK

pNPP

- 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pNPP, 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgCl_2 , 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ diethanolamin v H_2O ; pH = 9,8
- sterilizováno filtrací přes 0,22 μm filtr, uchováno při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

stop roztok

- 1% (w/v) bromfenolová modř, 70% (v/v) TE pufr, 30% (v/v) glycerol

TAE pufr (1× koncentrovaný)

- 40 mmol·l⁻¹ Tris, 20 mmol·l⁻¹ kyselina octová, 1 mmol·l⁻¹ EDTA; pH = 8,3

TE pufr

- 10 mmol·l⁻¹ Tris, 0,5 mmol·l⁻¹ EDTA; pH = 8,0
- sterilizováno filtrací přes 0,22μm filtr

TES pufr

- 10 mmol·l⁻¹ Tris, 2 mmol·l⁻¹ EDTA, 150 mmol·l⁻¹ NaCl, 1 mmol·l⁻¹ NaN₃;
pH = 8,0

4 Metody

4.1 Příprava reportérových vektorů pTW5-GFP a pTW5-SEAP

4.1.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR) k amplifikaci fragmentů DNA

V 500 µl PCR mikrokumavkách bylo smícháno:

5 µl 10× koncentrovaného reakčního pufru ThermoPol

1,5 µl deoxyribonukleotidtrifosfátového mixu (dNTP) o koncentraci 10 mmol·l⁻¹

1,5 µl síranu hořečnatého o koncentraci 100 mmol·l⁻¹

5 µl přímého primeru o koncentraci 5 µmol·l⁻¹ (Tab. 4.1)

5 µl reverzního primeru o koncentraci 5 µmol·l⁻¹ (Tab. 4.1)

10 ng templátu (Tab. 4.1)

0,5 µl Deep Vent DNA polymerázy

objem PCR vody do celkového objemu reakce 50 µl

Tato PCR směs byla vložena do termocykléru, ve kterém byl nastaven teplotní program:

5 min při 94 °C

30 cyklů: 30 s při 94 °C

30 s při 52 °C

1 min při 72 °C

10 min při 72 °C

4 °C – chladicí teplota, která byla udržována, než byly vzorky vyjmuty

Ke vzorkům bylo přidáno 5 µl stop roztoku. Vzorky byly vyhodnoceny pomocí agarózové elektroforézy.

Tab. 4.1: Použité primery a templáty pro PCR amplifikaci.

PCR produkt	templát	přímý primer	reverzní primer
GFP	pTTo-GFPq (c = 3,45 µg·µl ⁻¹)	GFP_FW	GFP_REV
SEAP	pTTo3c-SSH (c = 2,63 µg·µl ⁻¹)	SEAP_FW	SEAP_REV

4.1.2 Agarózová elektroforéza

Dlouhý 1,3% gel pro elektroforézu byl připraven rozpuštěním 1,24 g agarózy v 95 ml 1× koncentrovaného TAE pufru. Střední 1,3% gel byl připraven z 84,5 g agarózy a 65 ml 1× koncentrovaného TAE pufru. Po vychladnutí na přibližně 40 °C byly do roztoku přidány 3 µl Good View fluorescenční barvy. Roztok gelu byl přelit do aparatury na elektroforézu. Po ztuhnutí dlouhého gelu byl vyjmut hřeben a do prostoru odděleného elektrodami byl přidán 1× koncentrovaný TAE pufr, nad gel byla nalita destilovaná voda. Do první jamky bylo pipetováno 5 µl DNA markeru, do dalších jamek byly pipetovány celé objemy vzorků. Elektroforéza byla provedena při napětí 220 V po dobu 15 min. Vizualizace vzorků byla provedena nad UV prosvěcovací lampou.

4.1.3 Izolace z gelu pomocí kitu

Vzorky byly z gelu vyříznuty a přečištěny komerční soupravou JETquick Gel Extraction Spin Kit podle návodu výrobce: vyříznutý gel byl vložen do 1,5ml mikrozkuavek. Na 100 mg vyříznutého gelu bylo přidáno 300 µl roztoku L1 a 15 min inkubováno v kovovém blokovém termostatu při 50 °C. Roztok gelu byl přelit do kolonky umístěné ve sběrači a centrifugován 1 min při 12 000 × g, obsah byl ze sběrače vylit. Do kolonky bylo přidáno 500 µl roztoku L2, centrifugováno 1 min při 12 000 × g a obsah byl ze sběrače vylit. Pro vysušení byla kolonka ve sběrači znovu centrifugována 1 min při 12 000 × g. Kolonka byla přemístěna do čisté 1,5ml mikrozkuavky. Do kolonky bylo pipetováno 50 µl sterilní destilované vody předeřáté na 72 °C a centrifugováno 2 min při 14 000 × g. Koncentrace PCR produktů (pododdíl 4.1.1) byly zjištěny měřením analyzovaného vzorku na spektrofotometru proti sterilní destilované vodě.

4.1.4 Restrikce inzertů a linearizace plazmidu

Plazmid pTW5 byl linearizován v 1,5ml mikrozkuavce smícháním:

5 µl pTW5 o koncentraci 2,61 µg·µl⁻¹

3 µl 10× koncentrovaného NEB1 pufru

3 µl 10× koncentrovaného hovězího sérového albuminu (BSA)

0,5 µl restrikční endonukleázy *Age*I

0,5 µl restrikční endonukleázy *Kpn*I

2 µl sterilní destilované vody do celkového objemu reakce 20 µl

Inzerty GFP a SEAP byly připraveny odpařením roztoku s izolovanou DNA na vakuové DNA odparce objem 13 μl , a následnou restrikcí v 1,5ml mikrozkuhavce smícháním:

- 13 μl inzertu
- 3 μl 10 \times koncentrovaného NEB1 pufru
- 3 μl 10 \times koncentrovaného BSA
- 0,5 μl restrikční endonukleázy *AgeI*
- 0,5 μl restrikční endonukleázy *KpnI*

Restrikční směsi byly inkubovány 30 min při 37 °C. Štěpené vzorky byly analyzovány na agarózové elektroforéze (pododdíl 4.1.2), přečištěny a izolovány z gelu (pododdíl 4.1.3).

4.1.5 Ligace inzertu do vektoru

Koncentrace štěpených vektorů a inzertů z restrikce (pododdíl 4.1.4) byly zjištěny měřeními analyzovaného vzorku na spektrofotometru proti sterilní destilované vodě. Štěpené inzerty a vektory byly odpařeny na vakuové DNA odparce na objem 10 μl a smíchány:

- 10 μl inzertu
- objem pTW5 vektoru pro poměr koncentrací $c(\text{inzert}) : c(\text{vektor}) = 2 : 1$
- 2 μl pufru pro T4 DNA ligázu
- 1 μl T4 DNA ligázy
- objem sterilní destilované vody do celkového objemu reakce 20 μl

Bylo smícháno 10 μl GFP štěpeného inzertu o koncentraci 2,2 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ s 2 μl pTW5 štěpeného vektoru o koncentraci 5,2 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a 10 μl SEAP štěpeného inzertu o koncentraci 2,0 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ s 2 μl pTW5 štěpeného vektoru o koncentraci 5,2 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Ligační směsi byly inkubovány 30 min při laboratorní teplotě.

4.1.6 Transformace plazmidu do kompetentních buněk tepelným šokem

Kompetentní buňky *E. coli* kmene DH5 α byly uchovány při -80 °C. Pro transformaci byly ponechány roztát na ledu. K ligační směsi bylo přidáno 100 μl suspenze kompetentních buněk a směs byla inkubována 30 min na ledu. Byl proveden tepelný šok po dobu 60 s ve vodní lázni vyhřáté na 42 °C. K transformační směsi byl přidán objem 1 ml LB média předeřátého na 37 °C. Směs byla inkubována 40 min ve vodní lázni o teplotě 37 °C a centrifugována 4 min při 1 500 \times g a teplotě 21 °C. Supernatant byl odlit a ve zbytku resuspendován pelet. Vzniklá suspenze byla rozetřena na Petriho misku s LB

agarem s ampicilinem. Miska byla inkubována 16 h při 37 °C. Po 16 h byly misky s koloniemi uchovány v lednici při 4 °C.

4.1.7 PCR z kolonií a výběr pozitivních kolonií

Z každé misky byly vybrány 4 kolonie. Každá kolonie byla resuspendována v 6 µl PCR vody v 200µl PCR mikrozkuhavce. Byly přidány:

2 µl pTT_FW přímého primeru o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$

2 µl pTW5seq_REV reverzního primeru o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$

10 µl 2× koncentrovaného PCR roztoku „Combi PPP Master Mix“

Tato PCR směs byla vložena do termocykléru, ve kterém byl nastaven teplotní program:

5 min při 94 °C

30 cyklů: 30 s při 94 °C

30 s při 50 °C

1 min při 72 °C

10 min při 72 °C

4 °C – chladicí teplota, která byla udržována, než byly vzorky vyjmuty

Byla provedena agarózová elektroforéza (pododdíl 4.1.2) a určeny pozitivní kolonie.

4.1.8 Izolace plazmidové DNA pomocí kitu

Toutéž špičkou, kterou byla nabrána kolonie z misky pro PCR z kolonií (pododdíl 4.1.7), bylo očkováno 5 ml LB média s 5 µl ampicilinu v 50ml polypropylenové zkuhavce s kónickým dnem a šroubovým uzávěrem. Zkuhavka byla 16 h inkubována na třepačce inkubátoru při 220 RPM a 37 °C. Zkuhavka byla centrifugována 10 min při $4\,000 \times g$, supernatant vylit a pelet resuspendován v 1 ml TES pufru pomocí vortexového mixéru. Resuspendovaný pelet byl přelit do 1,5ml mikrozkuhavky, centrifugován 1 min při $14\,000 \times g$ a supernatant vylit.

Plazmidová DNA byla izolována komerční soupravou High-Speed Plasmid Mini Kit podle návodu výrobce: Pelet byl resuspendován ve 200 µl kompletního pufru PD1 pomocí vortexového mixéru. K roztoku bylo přidáno 200 µl pufru PD2, směs promíchána a 5 min inkubována při laboratorní teplotě. Ke směsi bylo přidáno 300 µl pufru PD3, promícháno a centrifugováno 3 min při $14\,000 \times g$. Supernatant byl přelit do kolonky umístěné ve sběrači a centrifugován 1 min při $14\,000 \times g$, obsah ze sběrače byl vylit. Do kolonky bylo přidáno 400 µl W1 pufru, centrifugováno 1 min při $14\,000 \times g$ a obsah ze

sběrače vylit. Do kolonky bylo přidáno 600 µl kompletního oplachovacího pufru, centrifugováno 1 min při $14\,000 \times g$, obsah ze sběrače vylit a kolonka opět centrifugována 3 min při $14\,000 \times g$ pro vysušení. Kolonka byla přemístěna do čisté 1,5ml mikrozskumavky. Do kolonky bylo přidáno 50 µl elučního pufru ohřátého na 70 °C a inkubováno 2 min při laboratorní teplotě. Kolonka byla centrifugována 2 min při $16\,000 \times g$. Koncentrace DNA byla změřena na spektrofotometru proti elučnímu pufru.

4.1.9 DNA sekvenování

Sekvence izolovaných plazmidových DNA byla provedena RNDr. Štěpánkou Hrdou v Laboratoři sekvenace DNA PřF UK v Praze na přístroji 3130 Genetic Analyzer. Podle získaných sekvenačních dat byly pro další zpracování vybrány vzorky, jejichž plazmidová DNA neobsahovala žádné chyby v aminokyselinové sekvenci.

4.2 Příprava zásobních roztoků plazmidů

4.2.1 Transformace buněk plazmidovou DNA a její produkce

Kompetentní buňky *E. coli* kmene DH5α byly uchovány při -80 °C. Pro transformaci byly ponechány roztát na ledu. Každých 100 µl suspenze kompetentních buněk bylo transformováno přidavkem 100 ng DNA z pododdílu 4.1.8. a dále bylo postupováno podle pododdílu 4.1.6. Po 16 h byl na každou Petriho misku pipetován objem 5 ml LB média a pomocí skleněné hokejky byly buňky uvolněny a následně pipetovány do sterilních 2l Erlenmayerových baněk obsahujících 0,5 l LB média a 0,5 ml ampicilinu. Baňky byly inkubovány 16 h na třepačce inkubátoru při 220 RPM a 37 °C.

Poté byl obsah každé baňky rozdělen do dvou 250ml polypropylenových kopolymerových lahviček a centrifugován 30 min při $4\,000 \times g$, supernatant vylit a pelet resuspendován v 20 ml TES pufru pomocí vortexového mixéru. Resuspendovaný pelet byl přenesen do 30ml polypropylenových kopolymerových centrifugačních kyvet s kulatým dnem, určených výhradně pro bakterie, centrifugován 15 min při $15\,000 \times g$ a supernatant vylit. Takto připravené pelety byly zmrazeny a uchovány pro přípravu zásobního roztoku plazmidové DNA.

4.2.2 Izolace plazmidové DNA a její velkoobjemová příprava

Plazmidová DNA byla izolována komerční soupravou NucleoBond Xtra Maxi. Pelet byl resuspendován v 9 ml kompletního RES pufru pomocí vortexového mixéru. K roztoku bylo přidáno 9 ml lyzačního LYS pufru, směs důkladně promíchána a 5 min inkubována při laboratorní teplotě. Ke směsi bylo přidáno 9 ml neutralizačního NEU pufru, důkladně promícháno do úplného odbarvení obsahu kyvety a centrifugováno 10 min při $20\,000 \times g$. Supernatant byl přelit přes filtrační papír na kolonu, která byla ekvilibrována 2×25 ml EQU pufru. Po prokapání supernatantu byla kolona promyta 25 ml WASH pufru. Následně byla DNA z kolony eluována 15 ml ELU pufru do polypropylenových kopolymerových centrifugačních kyvet s kulatým dnem, určených výhradně pro DNA.

K eluátu bylo přidáno 10,5 ml isopropanolu vychlazeného na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, protřepáno a centrifugováno 30 min při $16\,000 \times g$ a teplotě $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, supernatant byl vylit. Poté bylo k peletu přidáno 5 ml 70% ethanolu vychlazeného na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a kývavým pohybem byl pelet omyt. Opět byla kyveta centrifugována 10 min při $16\,000 \times g$ a teplotě $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, supernatant následně vylit. Pelet byl vysušen v rotační vakuové DNA odparce. Vysušený pelet byl rozpuštěn v 1 ml sterilní destilované vody či TE pufru a přenesen do mikrozkušavky. Koncentrace a čistota DNA byla změřena na spektrofotometru proti destilované vodě při vlnových délkách 260 nm a 280 nm.

Koncentrace roztoku DNA byla vypočtena z empirického vztahu, podle kterého má roztok $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dvouvláknové DNA absorpanci (měřené při 260 nm) rovnou 1. Poměr absorpací měřených při 260 nm ku 280 nm je pro čistý roztok DNA roven přibližně 1,8. Následně byla provedena kontrola agarózovou elektroforézou (pododíl 4.1.2). Pokud byly roztoky DNA v pořádku, byly sterilizovány filtrací přes $0,22\mu\text{m}$ filtr a uchovány v mrazicím boxu o teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3 Kultivace a uchovávání buněčné linie HEK293T

4.3.1 Určení buněčné hustoty a viability použitím hemocytometru

Určení buněčné hustoty bylo provedeno manuálním počítáním buněk na hemocytometru. Bylo odebráno 20 μl buněčné suspenze HEK293T do sterilní mikrozkušavky, zředěno 20–60 μl 0,4% roztoku trypanové modři v PBS-TK a inkubováno 5 min při laboratorní teplotě. Poté bylo 20 μl zředěné suspenze pipetováno pod krycí sklíčko hemocytometru. Pod mikroskopem byly následně počítány živé

průhledné i mrtvé modré buňky v jednotlivých polích hemocytometru. Buněčná hustota v jednotkách 10^6 ml^{-1} byla vypočtena z průměrného počtu živých buněk v poli vynásobená ředěním a faktorem 10^4 , který vyplývá z rozměrů hemocytometru. Viabilita odpovídá podílu počtu živých buněk ku celkovému počtu buněk.

4.3.2 Příprava mrazicího a kultivačního média

Mrazicí médium pro buňky HEK293T bylo připraveno smícháním:

45 % objemu použitého kultivačního média

45 % objemu čerstvého kultivačního média

10 % objemu dimethylsulfoxidu (DMSO)

Kultivační médium pro buňky HEK293T bylo připraveno smícháním:

50 % objemu kompletního FreeStyle F17 média (oddíl 3.2)

50 % objemu kompletního ExCELL293 média (oddíl 3.2)

4.3.3 Zmrazování a rozmrazování buněčné linie HEK293T

Pro uchování buněk byly buněčné suspenze zmrazeny obvykle v 5 alikvotech o objemu 1 ml a buněčné hustotě $5 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Nejprve byla spočítána buněčná hustota (pododdíl 4.3.1), následně byl daný objem suspenze obsahující $30 \cdot 10^6$ buněk centrifugován v 50ml sterilních polypropylenových zkumavkách s kónickým dnem a šroubovým uzávěrem 5 minut při $200 \times g$, supernatant byl dekantován a pelet resuspendován mrazicím médiem na buněčnou hustotu suspenze $5 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Mrazicí médium bylo připraveno podle pododdílu 4.3.2. Tato suspenze byla následně rozdělena po 1 ml do kryozkumavek a zmrazena pomocí mrazicího kontejneru s kontrolovaným poklesem teploty o rychlosti $1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ umístěným do mrazicího boxu o teplotě -80°C , kde byly poté buňky skladovány.

Pro kultivaci buněčné linie HEK293T byl její alikvot rychle rozmrazen ve vodní lázni o teplotě 37°C , přenesen do 9 ml ExCELL293 média předehřátého na 37°C v 15ml sterilní polypropylenové zkumavce s kónickým dnem a šroubovým uzávěrem a promíchán. Zkumavka byla následně centrifugována 5 min při $200 \times g$, supernatant odstraněn a pelet resuspendován na výsledný objem 10 ml kultivačního média předehřátého na 37°C (pododdíl 4.3.2). Následně byla buněčná suspenze přenesena na 10cm sterilní Petriho misku a ponechána v inkubátoru pro tkáňové kultury při 37°C v 5% CO_2 atmosféře.

4.3.4 Kultivace HEK293T buněčné linie

První fáze buněčné kultivace probíhala na 10cm Petriho misce (pododdíl 4.3.3) a po 3–4 dnech byla spočítána buněčná hustota a daný objem buněčné suspenze byl přenesen do 100ml sterilní hranaté skleněné lahvičky se šroubovacím prodyšným víčkem a zředěn čerstvým kultivačním médiem předehřátým na 37 °C (pododdíl 4.3.2) na celkový objem 30 ml a buněčnou hustotu přibližně 0,2–0,3. Poté byla lahvička třepána v inkubátoru pro tkáňové kultury při 135 RPM ($r = 19$ mm) o teplotě 37 °C v 5% CO₂ atmosféře.

Takto kultivované buňky byly udržovány jako zásobní kultura v rozmezí buněčné hustoty přibližně 0,2–5,0 a každé 3–4 dny ředěny čerstvým kultivačním médiem vždy předehřátým na 37 °C na celkový objem 30 ml a buněčnou hustotu 0,2–0,3. Zásobní kultura byla následně používána k optimalizačním testům. V případě potřeby většího množství buněk bylo buněčnou suspenzí očkováno kultivační médium ve větší sterilní hranaté skleněné láhvi se šroubovacím prodyšným víčkem tak, aby nebylo překročeno rozmezí buněčné hustoty 0,2–5,0. Optimální celkový objem ředěné suspenze je 30 % objemu láhve. Pro optimalizační testy byly buňky kultivovány 3–4 dny v objemu 75 ml v 250ml lahvičce či 150 ml v 500ml láhvi a následně použity pro tranzientní transfekci.

4.4 Tranzientní transfekce HEK293T buněčné linie

4.4.1 Příprava kultivované buněčné suspenze pro transfekci

Byla spočítána buněčná hustota a viabilita buněčné kultury podle pododdílu 4.3.1 a následně podle optimalizačních podmínek odebráno potřebné množství buněk 25ml sterilní pipetou do 50ml sterilních polypropylenových zkumavek s kónickým dnem a šroubovým uzávěrem a centrifugováno 5 min při $200 \times g$. Buňky byly poté dekantovány a resuspendovány na požadovaný objem kompletním FreeStyle F17 médiem předehřátým na 37 °C. Tato suspenze byla rozdělena po daných objemech na 24jamkové sterilní destičky či do 100ml sterilních hranatých skleněných lahviček se šroubovacím prodyšným víčkem. Následně byla přidána příslušná inkubovaná transfekční směs (pododdíl 4.4.2) a destičky či lahvičky třepány v inkubátoru pro tkáňové kultury při 135 RPM ($r = 19$ mm) o teplotě 37 °C v 5% CO₂ atmosféře. Po 3–4 h byly jednotlivé transfekované buněčné suspenze převedeny na 12jamkové destičky či do 100ml sterilních hranatých skleněných lahviček, zředěny na buněčnou hustotu $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ daným objemem ExCELL293 média předehřátého na 37 °C a vráceny do inkubátoru.

4.4.2 Příprava transfekční směsi plazmidové DNA a IPEI

Transfekční směs byla připravena podle optimalizačních podmínek ve sterilní mikrozkušavce zředěním příslušných objemů roztoků plazmidů daným objemem PBS-TK. Následně bylo podle optimalizačních podmínek do mikrozkušavky přidáno příslušné množství $1\times$ koncentrovaného lineárního PEI (IPEI), promícháno a inkubováno při laboratorní teplotě požadovaný čas. Ihned po inkubaci byla transfekční směs přidána k buněčné suspenzi z pododdílu 4.4.1. Objem PBS-TK byl zvolen tak, aby výsledná koncentrace DNA v suspenzi při transfekci byla řádově $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a současně celkový objem transfekční směsi nepřekročil desetinu objemu suspenze při transfekci. Konkrétní podmínky jsou uvedeny v kapitole 5.

Nejprve byl optimalizován poměr DNA : IPEI. Pro tento test bylo použito konstantní množství $2\ \mu\text{g}$ DNA směsi na 10^6 buněk a proměnnou bylo množství IPEI. Tato směs DNA obsahovala pouze plazmidy pTW5-SEAP a pTW5-GFP v hmotnostním poměru 19 : 1 [14]. Optimální poměr DNA : IPEI byl dále použit v testech optimalizujících množství DNA s regulačními geny. Transfekční směs pro tyto testy obsahovala konstantní množství $2\ \mu\text{g}$ DNA směsi na 10^6 buněk a konstantní množství IPEI. Proměnnou bylo zastoupení DNA s jednotlivými regulačními geny. Tyto směsi DNA obsahovaly konstantní množství plazmidů pTW5-SEAP a pTW5-GFP v hmotnostním poměru 19 : 1 [14] a různá množství regulačních DNA. Celkové množství $2\ \mu\text{g}$ DNA na 10^6 buněk bylo doplněno daným množstvím tzv. prázdného plazmidu pTT5.

4.5 Stanovení a vyhodnocení reportérových proteinů

4.5.1 Stanovení úspěšnosti transfekce měřením fluorescence GFP

Nejprve byla změřena buněčná hustota a viabilita pomocí hemocytometru podle pododdílu 4.3.1. Pro měření fluorescence GFP byl následně odebrán objem 20–200 μl produkující buněčné suspenze HEK293T tranzientně transfekované plazmidem pTW5-GFP a zásobní kultury HEK293T (slepý vzorek) na 96jamkovou destičku s kulatým dnem. Destička byla centrifugována 5 min při $200\times g$, supernatant vylit a pelety resuspendovány v 190 μl PBS-TK. Následně bylo v několika testech do každé jamky pipetováno 10 μl roztoku propidium jodidu (PI) o koncentraci $0,5\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro určení viability měřených buněk. Ihned po přidavku PI byly buňky měřeny na průtokovém cytometru BD LSR II (Laboratoř genomických a proteomických technik, PŘF UK v Praze).

Zaznamenáváno bylo 50 000 událostí, u kterých byly měřeny tyto parametry: plocha a výška přímého rozptylu světla (FSC-A, FSC-H), plocha a výška bočního rozptylu světla (SSC-A, SSC-H), fluorescence PI (PI-A) a GFP (GFP-A) za využití templátového nastavení excitace při 561 nm, resp. 488 nm.

Naměřená data byla následně vyhodnocena v programu BD FACSDiva vytvořením populačních grafů a histogramů, ve kterých byly vybrány požadované populace: nejprve byla vybrána ze všech zaznamenaných událostí populace singletů nad diagonálou v grafu FSC-A/FSC-H. Z této populace byla následně vybrána subpopulace buněk HEK293T v grafu FSC-A/SSC-A, který třídí události podle jejich velikosti a struktury. V grafu PI-A/SSC-A, který třídí události podle míry fluorescence PI, byla následně ze subpopulace buněk HEK293T vybrána množina živých buněk – PI negativních (PI^-) – a z této množiny byla z grafu GFP-A/SSC-A, který třídí události podle míry fluorescence, vybrána podmnožina buněk úspěšně transfekovaných plazmidem pTW5-GFP – GFP pozitivních (GFP^+). Úspěšnost transfekce byla vyhodnocena jako procento GFP^+ z celkové populace živých buněk PI^- . Naměřená data byla následně exportována do tabulkového editoru MS Office Excel 2003, ve kterém byla data dále zpracována do podoby grafů.

4.5.2 Stanovení výtěžku exprese měřením enzymové aktivity SEAP

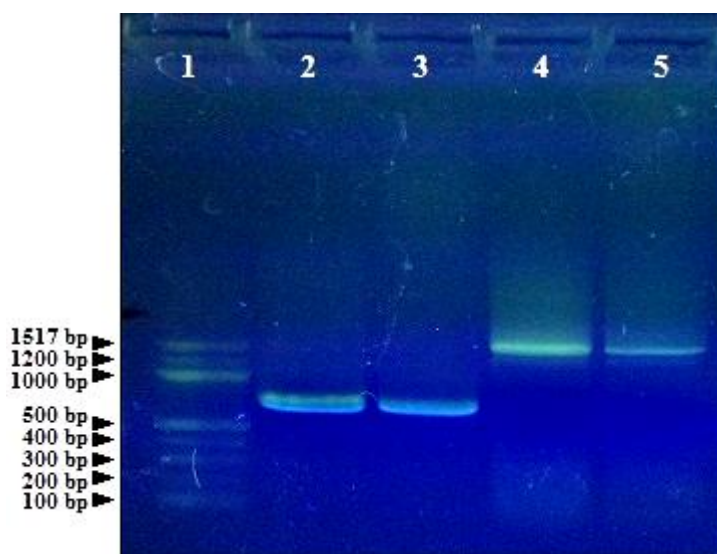
Pro měření enzymové aktivity SEAP byl odebrán objem 20–200 μ l produkující buněčné suspenze HEK293T tranzientně transfekované plazmidem pTW5-SEAP do mikrozkuhavky a centrifugován 5 min při $200 \times g$. Supernatant byl následně v triplikátu postupně ředěn na 96jamkové destičce s plochým dnem destilovanou vodou. Ředění supernatantu v závislosti na typu testu bylo 10krát, 100krát a 1000krát nebo 100krát, 1000krát a 10 000krát na objem 180 μ l. Poté bylo do každé jamky pipetováno osmikanálovou manuální pipetou 20 μ l pNPP o koncentraci $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, aby byla výsledná koncentrace pNPP v jamce $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ [5] a ihned měřena absorbance při 410 nm každých 30 s po dobu 10 min na spektrofotometrické automatické čtečce Sunrise. Jako slepý vzorek bylo použito 180 μ l destilované vody taktéž s 20 μ l pNPP.

Získaná data byla přenesena do tabulkového editoru MS Office Excel 2003, ve kterém byla následně vyhodnocena výpočtem směrnice lineární regrese. Hodnoty absorbance, které byly záporné, extrémně odlehle či větší než 0,900 byly z vyhodnocení vyloučeny. Úroveň exprese SEAP reprezentující výtěžek exprese byla vypočítána jako průměr hodnot úrovně exprese SEAP jednotlivých měření triplikátu. Z těchto hodnot byla stanovena také směrodatná odchylka.

5 Výsledky

5.1.1 Příprava reportérových plazmidů pTW5-GFP a pTW5-SEAP

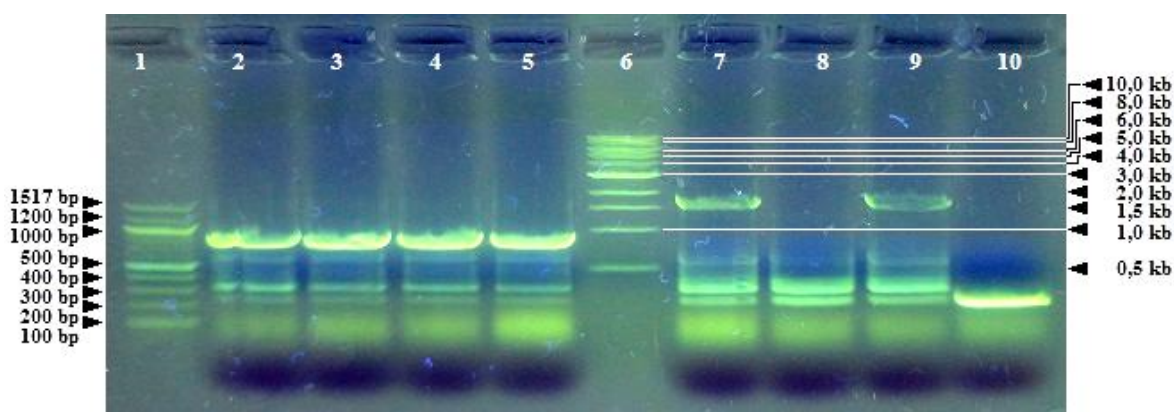
Pro vytvoření plazmidů pTW5-GFP a pTW5-SEAP byly nejprve amplifikovány fragmenty GFP a SEAP prostřednictvím PCR z plazmidů pTTo-GFPq a pTTo3c-SSH [14]. Během amplifikace byly také prodlouženy o sekvence rozpoznávané restrikčními endonukleázami *AgeI* a *KpnI*. Takto připravené PCR produkty byly následně analyzovány a ověřeny agarózovou elektroforézou (Obr. 5.1).



Obr. 5.1: Vyhodnocení PCR amplifikace GFP a SEAP agarózovou elektroforézou.

V dráze 1 je 100bp DNA marker, v drahách 2 a 3 je PCR produkt pro GFP (724 bp), v drahách 4 a 5 je PCR produkt pro SEAP (1631 bp).

V dalším kroku byly tyto fragmenty vloženy do vektoru pTW5 [114] prostřednictvím restrikčních endonukleáz *AgeI* a *KpnI*. Takto vytvořenými plazmidy byly transformovány DH5α kompetentní buňky prostřednictvím tepelného šoku. Buňky byly následně kultivovány na LB agaru s ampicilinem a inkubovány při 37 °C. Z narostlých kolonií byly následně vybrány 4 kolonie a provedena PCR z kolonií pro určení pozitivních klonů. Získané produkty byly analyzovány agarózovou elektroforézou (Obr. 5.2, str. 42).



Obr. 5.2: Vyhodnocení PCR produktů z kolonií DH5α buněk transformovaných plasmidy s reportérovými geny GFP a SEAP.

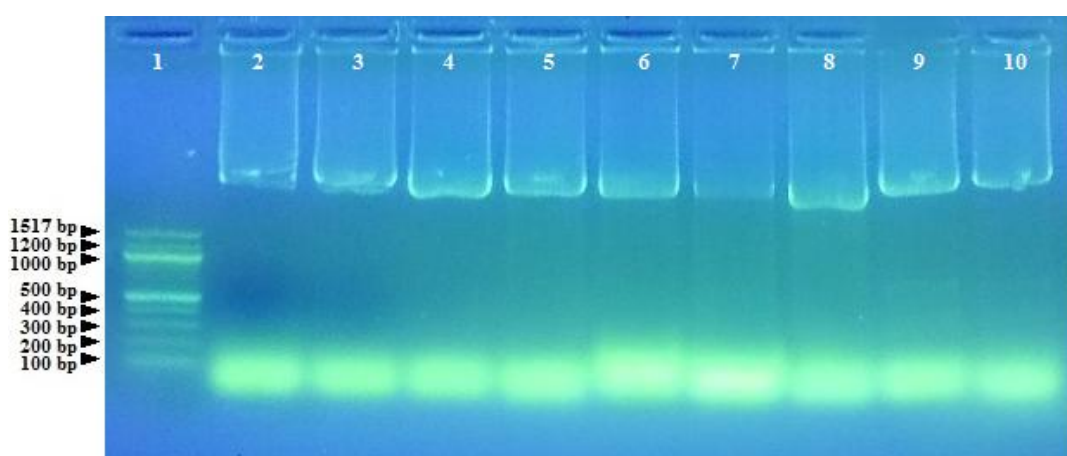
V dráze 1 je 100bp DNA marker, v drahách 2–5 je PCR produkt pro plazmid pTW5-GFP (969 bp) z kolonií G1–4, v dráze 6 je 1kb DNA marker, v drahách 7–10 je PCR produkt pro plazmid pTW5-SEAP (1876 bp) z kolonií S1–4.

Buněčné klony pozitivní na pTW5-GFP či pTW5-SEAP byly kultivovány v LB médiu s ampicilinem při 220 RPM a 37 °C. Z bakteriálních kultur byla následně izolována plazmidová DNA a správnost nukleotidové sekvence DNA byla následně ověřena sekvenací, kterou provedla RNDr. Štěpánka Hrdá (PřF UK). Získané sekvence byly porovnány s požadovanou sekvencí plasmidu pTW5-GFP, resp. pTW5-SEAP. Správnou nukleotidovou sekvenci obsahoval vzorek plazmidové DNA z kolonie G4 (pTW5-GFP), avšak S1 (pTW5-SEAP) obsahovala navíc CTG sekvenci v oblasti sekrečního signálu. Sekreční signál SEAP obsahuje sedm po sobě jdoucích leucinů. Triplet CTG kóduje taktéž leucin, sekreční signál by byl tudíž prodloužen na osm po sobě jdoucích leucinů. Proto byla provedena zkušební tranzientní transfekce podle klasického postupu (viz pododdíl 5.1.3, poměr DNA : IPEI = 1 : 3), zda se skutečně SEAP sekretuje do transfekčního média. Přítomnost SEAP byla měřena prostřednictvím pNPP 2 a 4 dny po transfekci (dpt). Výsledky na přítomnost SEAP v médiu byly pozitivní a mohli jsme tak tuto sekvenci SEAP považovat za poskytující funkční enzym.

5.1.2 Příprava zásobních roztoků všech plazmidů používaných pro tranzientní transfekci HEK293T buněčné linie

V posledním kroku byly připraveny zásobní roztoky všech plazmidových DNA, tedy pTW5-p18, pTW5-p21, pTW5-p27, pTW5-aFGF, pTW5-bcl2, pTW5-bclx, pTT5, pTW5-GFP a pTW5-SEAP. Po ověření sekvenací byly opět transformovány DH5α kompetentní buňky prostřednictvím tepelného šoku. Buňky byly poté kultivovány na LB

agaru s ampicilinem při 37 °C, dále přeneseny do LB média s ampicilinem a kultivovány při 220 RPM a 37 °C. Z bakteriálních kultur byla následně pomocí kitu izolována plazmidová DNA a rozpuštěna ve sterilní destilované vodě. Celistvost a velikost plazmidů byla zkontrolována agarózovou elektroforézou a spektrofotometricky byla stanovena čistota a koncentrace DNA. Poté byly roztoky sterilizovány filtrací a uchovány v mrazicím boxu při –20 °C. Po neúspěšných pokusech o transfekci buněčné linie HEK293T byla znovu zkontrolována plazmidová DNA agarózovou elektroforézou. Během 4 měsíců skladování v mrazicím boxu byla plazmidová DNA v roztoku degradována, pravděpodobně z důvodu opakovaného rozmrazování a zmrazování (Obr. 5.3).



Obr. 5.3: Agarózová elektroforéza degradovaných plazmidů.

V dráze 1 je 100bp DNA marker, v drahách 2–7 jsou regulační plazmidy pTW5-p18, -p21, -p27, -aFGF, -bcl2, -bclx, v drahách 8 a 9 jsou reportérové plazmidy pTW5-GFP a -SEAP, v dráze 10 je prázdný plazmid pTT5.

Byl proto vytvořen nový postup, při kterém byla DNA rozpuštěna v TE pufru, roztok byl následně sterilizován filtrací, rozdělen do několika sterilních mikrozskumavek a zmražen při –80 °C. Pro přípravu transfekční směsi tak byl vždy rozmražen pouze jeden alikvot, který byl následně uchováván při –20 °C a během 1–2 měsíců spotřebován. Zkušební transfekcí podle obvyklého postupu (pododdíl 5.1.3, poměr DNA : IPEI = 1 : 3, inkubace transfekční směsi 5 min) a následným měřením aktivity SEAP 3 dpt bylo ověřeno, že TE pufr neovlivňuje transfekci buněk. Takto připravené a uchovávané plazmidy nedegradovaly a mohly tak být použity pro úspěšnou transfekci HEK293T buněčné linie.

5.1.3 Optimalizace poměru DNA : IPEI v transfekční směsi a porovnání vlivu pTT5 a pTW5 vektorů na expresní systém HEK293T buněk

Prvním úkolem bylo porovnat expresi HEK293T buněk tranzientně transfekovaných směsí pTW5-SEAP–pTW5-GFP a pTTo-GFPq–pTTo3c-SSH. Transfekce byla provedena klasickým postupem: den před transfekcí byl odebrán daný počet buněk ze zásobní kultury HEK293T buněk, v tomto případě $12 \cdot 10^6$ buněk. Buňky byly centrifugovány 5 min při $200 \times g$ a následně resuspendovány v čerstvém FreeStyle F17 médiu na buněčnou hustotu $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Tato suspenze byla rozdělena po 1 ml do jamek na sterilní 12jamkové destičce a kultivována do dalšího dne (přibližně 24 h) při 135 RPM a 37°C v 5% CO_2 atmosféře.

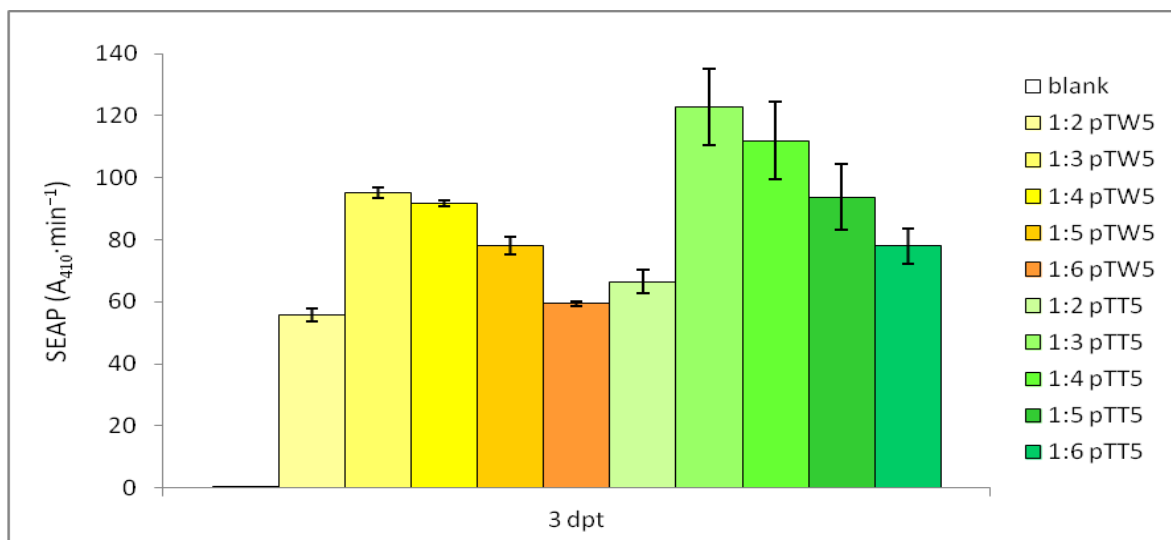
V den transfekce byla do každé jamky, jejíž předpokládaná buněčná hustota byla nyní dvojnásobná, přidána její transfekční směs vždy obsahující $1 \mu\text{g}$ DNA na 10^6 buněk (v tomto případě tedy $2 \mu\text{g}$ DNA) v poměru GFP : SEAP = 1 : 19. Transfekční směs byla zředěna 140 μl PBS-TK, aby výsledná koncentrace DNA v buněčné suspenzi byla v řádu desítek $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. K této směsi bylo následně přidáno dané množství IPEI o koncentraci $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ tak, aby byl poměr DNA : IPEI roven 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, 1 : 5 a 1 : 6 (Tab. 5.1). Takto připravená transfekční směs byla promíchána, inkubována 5 min při laboratorní teplotě a ihned poté přidána k buněčné suspenzi. Destička byla vrácena do inkubátoru a inkubována 4 h při 135 RPM a 37°C v 5% CO_2 atmosféře. Poté byly suspenze zředěny 1 ml ExCELL293 média na buněčnou hustotu $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$.

Tab. 5.1: Použitá množství DNA a IPEI pro přípravu transfekčních směsí.

DNA : IPEI, vektor	1 : 2 pTT5	1 : 3 pTT5	1 : 4 pTT5	1 : 5 pTT5	1 : 6 pTT5
pTTo-GFPq (μg)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
pTTo3c-SSH (μg)	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
IPEI (μg)	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0
DNA : IPEI, vektor	1 : 2 pTW5	1 : 3 pTW5	1 : 4 pTW5	1 : 5 pTW5	1 : 6 pTW5
pTW5-GFP (μg)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
pTW5-SEAP (μg)	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
IPEI (μg)	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0

Aktivita SEAP byla stanovena 3 dpt a fluorescence GFP 4 dpt (Obr. 5.4, str. 45). Jako optimální při uvedených transfekčních podmínkách byl vybrán poměr DNA : IPEI = 1 : 3 při uvedených transfekčních podmínkách. Následně byly porovnány

jednotlivé výtěžky SEAP při transfekci pTT5 a pTW5 vektorem. Z naměřených dat však nebyla potvrzena vyšší exprese při transfekci pTW5 vektorem [14]. Z výsledků vyplývá, že sekvence WPRE nemá na expresi HEK293T buněk pozitivní vliv (Obr. 5.4).



Obr. 5.4: Srovnání tranzientní transfekce HEK293T buněk vektory pTW5 a pTT5.

Transfekce byla provedena v 12jamkové destičce v kultuře o objemu 1 ml a buněčné hustotě $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Transfekční směs obsahovala 2 μg DNA (SEAP : GFP = 19 : 1) a 4–12 μg IPEI. Suspenze byla po 3 h zředěna na 2 ml a buněčnou hustotu $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Každý sloupec reprezentuje průměr duplikátu měření SEAP 3 dny po transfekci.

Dalším krokem byla optimalizace transfekčního postupu, vycházejícího z vysokohustotní transfekce HEK293E buněčné linie regulačními plazmidy [17,18]. Byla optimalizována buněčná hustota suspenze při transfekci, složení transfekční směsi a délka inkubace po přidavku IPEI. V rámci prvního experimentu bylo v den transfekce odebráno $170 \cdot 10^6$ buněk ze zásobní kultury. Buňky byly centrifugovány 5 min při $200 \times g$ a následně resuspendovány v čerstvém FreeStyle F17 médiu na buněčnou hustotu $22,2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. suspenze byla rozdělena po 900 μl ($20 \cdot 10^6$ buněk) do sterilních 50ml zkumavek s kónickým dnem a prodyšným víčkem. Poté byla k suspenzi přidána její transfekční směs obsahující 2 μg DNA (SEAP : GFP = 19 : 1) na $1 \cdot 10^6$ buněk, tedy 38 μg pTW5-SEAP a 2 μg pTW5-GFP, a takové množství PBS-TK, aby celkový objem transfekční směsi včetně IPEI byl 100 μl . Ihned po přidavku DNA do suspenze bylo přidáno dané množství IPEI o koncentraci 1 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ tak, aby byl poměr DNA : IPEI roven 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, 1 : 5, 1 : 6 a dvě kontrolní podmínky 1 : 0 a 0 : 0. Zkumavky byly inkubovány 3 h při 145 RPM ($r = 50 \text{ mm}$) a 37°C v 5% CO_2 atmosféře. Poté bylo ze suspenze odebráno 500 μl a zředěno 9,5 ml ExCELL293 média na buněčnou hustotu $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Po 3 dnech

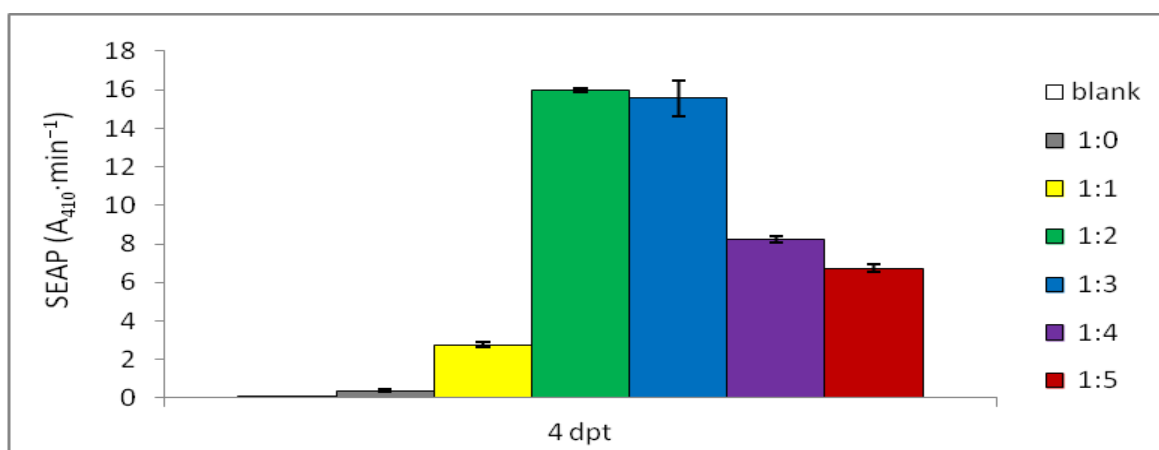
byla měřena fluorescence GFP na cytometru. Veškeré vzorky vykazovaly téměř nulové množství fluoreskujících buněk, což poukazovalo na neúspěšnost transfekce.

V dalším experimentu byl proto změněn postup přípravy transfekční směsi a snížen celkový objem suspenze. Příprava buněčné suspenze probíhala stejným způsobem uvedeným výše. Transfekční směs byla připravena opět smícháním PBS-TK a DNA, avšak tentokrát byl ke směsi přidán IPEI a směs promíchána (Tab. 5.2).

Tab. 5.2: Použitá množství pro přípravu transfekčních směsí.

DNA : IPEI	1 : 0	1 : 1	1 : 2	1 : 3	1 : 4	1 : 5
pTW5-GFP (μg)	2	2	2	2	2	2
pTW5-SEAP (μg)	38	38	38	38	38	38
IPEI (μg)	0	40	80	120	160	200

Teprve pak byla transfekční směs přidána k suspenzi. Buňky byly opět inkubovány 3 h při 145 RPM ($r = 50 \text{ mm}$) a 37°C v 5% CO_2 atmosféře. Poté bylo ze suspenze odebráno 750 μl a zbytek byl doplněn 4,75 ml ExCELL293 média na buněčnou hustotu $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Po 4 dnech byla měřena fluorescence GFP na cytometru, která potvrdila úspěšnost transfekce 38–50 %. Dále byla stanovena aktivita SEAP na spektrofotometru (Obr. 5.5). Optimální pro transfekci buněk při použití 2 μg DNA na $1 \cdot 10^6$ buněk je poměr DNA : IPEI = 1 : 2.



Obr. 5.5: Optimalizace poměru DNA : IPEI při vysokohustotní transfekci buněk HEK293T.

Transfekce byla provedena v 50ml zkumavkách s kónickým dnem a prodyšným víčkem v objemu 900 μl o buněčné hustotě $22,2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Transfekční směs o objemu 100 μl obsahovala 40 μg DNA (SEAP : GFP = 19 : 1) a 40–200 μg IPEI. Suspenze byla po 3 h zředěna na 5 ml o buněčné hustotě $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Každý sloupec reprezentuje průměr triplikátu 4 dny po transfekci.

Nízké množství SEAP v médiu však jasně dokazovalo problematickou kultivaci ve zkumavkách s kónickým dnem, která se i při inkubaci na třepačce projevovala vysokou sedimentací buněk v suspenzi vedoucí k vysoké úmrtnosti buněk. Proto byly provedeny další testy, při kterých byly buňky HEK293T pouze odebrány ze zásobní suspenze a kultivovány v těchto zkumavkách v objemech 1–2,5 ml při vysokých otáčkách 140–160 RPM ($r = 50$ mm) a 180–190 RPM ($r = 25$ mm). Nepodařilo se však nalézt žádné podmínky, při kterých by buňky nesedimentovaly v nezanedbatelné míře. V dalších experimentech byly proto místo těchto zkumavek použity jiné kultivační nádoby.

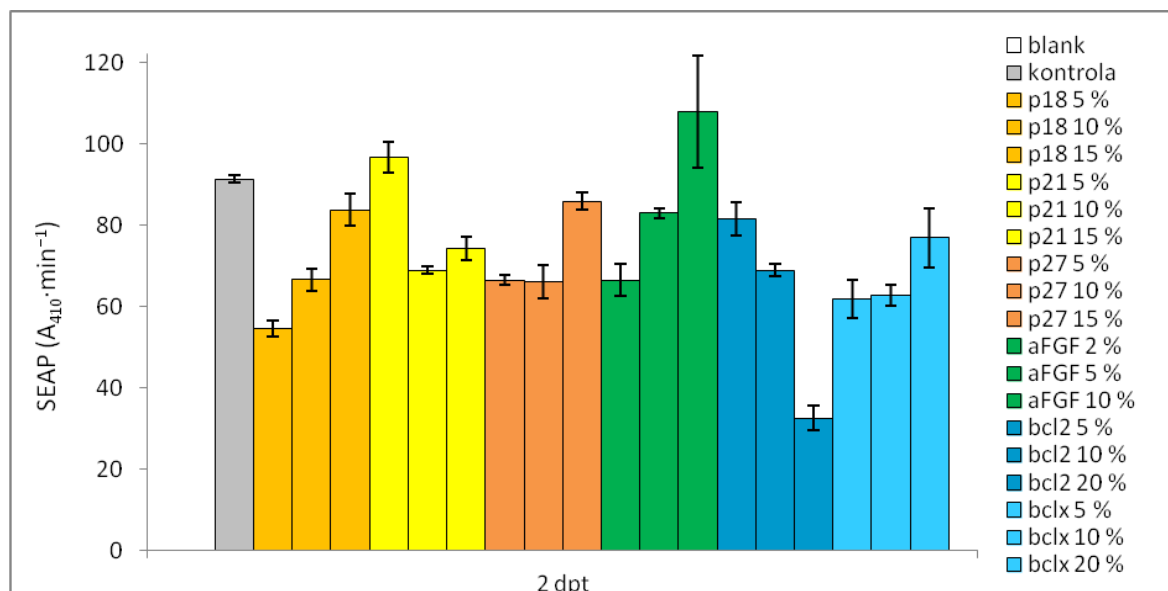
5.1.4 Transfekce buněk HEK293T regulačními geny za účelem optimalizace použité kultivační nádoby a buněčné hustoty

Nejprve byly vyzkoušeny 12jamkové destičky, které jsou běžně používány pro vysokohustotní transfekci buněk HEK293S. Bylo odebráno $800 \cdot 10^6$ buněk, centrifugováno 5 min při $200 \times g$ a pelet resuspendován v čerstvém FreeStyle F17 médiu na buněčnou hustotu $20 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Suspenze byla poté rozdělena po 1 ml do jamek na sterilních 12jamkových destičkách. Poté byla do každé jamky přidána příslušná transfekční směs. Transfekční směs obsahovala 2 μg DNA na $1 \cdot 10^6$ buněk, poměr DNA : IPEI = 1 : 2. Směs DNA obsahovala vždy 80 % směsi GFP a SEAP (1 : 19) a zbývajících 20 % tvořily různé poměry jednotlivých regulačních plazmidů a prázdného plazmidu pTT5 (Tab. 5.3).

Tab. 5.3: Použité objemy DNA a IPEI ($c = 1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) k přípravě transfekčních směsí.

X	podíl pTW5-X	pTW5-GFP	pTW5-SEAP	pTW5-X	pTT5	IPEI
p18/p21/p27	5 %			2 μl	6 μl	
	10 %	1,6 μl	30,4 μl	4 μl	4 μl	80 μl
	15 %			6 μl	2 μl	
aFGF	2 %			0,8 μl	7,2 μl	
	5 %	1,6 μl	30,4 μl	2 μl	6 μl	80 μl
	10 %			4 μl	4 μl	
bcl2/bclx	5 %			2 μl	6 μl	
	10 %	1,6 μl	30,4 μl	4 μl	4 μl	80 μl
	20 %			8 μl	0 μl	
–	0 %	1,6 μl	30,4 μl	0 μl	8 μl	80 μl

Směs byla ihned po přidavku IPEI promíchána a přidána do jamek k buněčné suspenzi. Destičky byly inkubovány 3,5 h při 135 RPM a 37 °C v 5% CO₂ atmosféře. Poté bylo ze suspenze odebráno 900 µl a zbytek byl zředěn 1,9 ml ExCELL293 média na buněčnou hustotu $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Následně byla měřena fluorescence GFP 2 dpt a aktivita SEAP 2 a 4 dpt (Obr. 5.6).

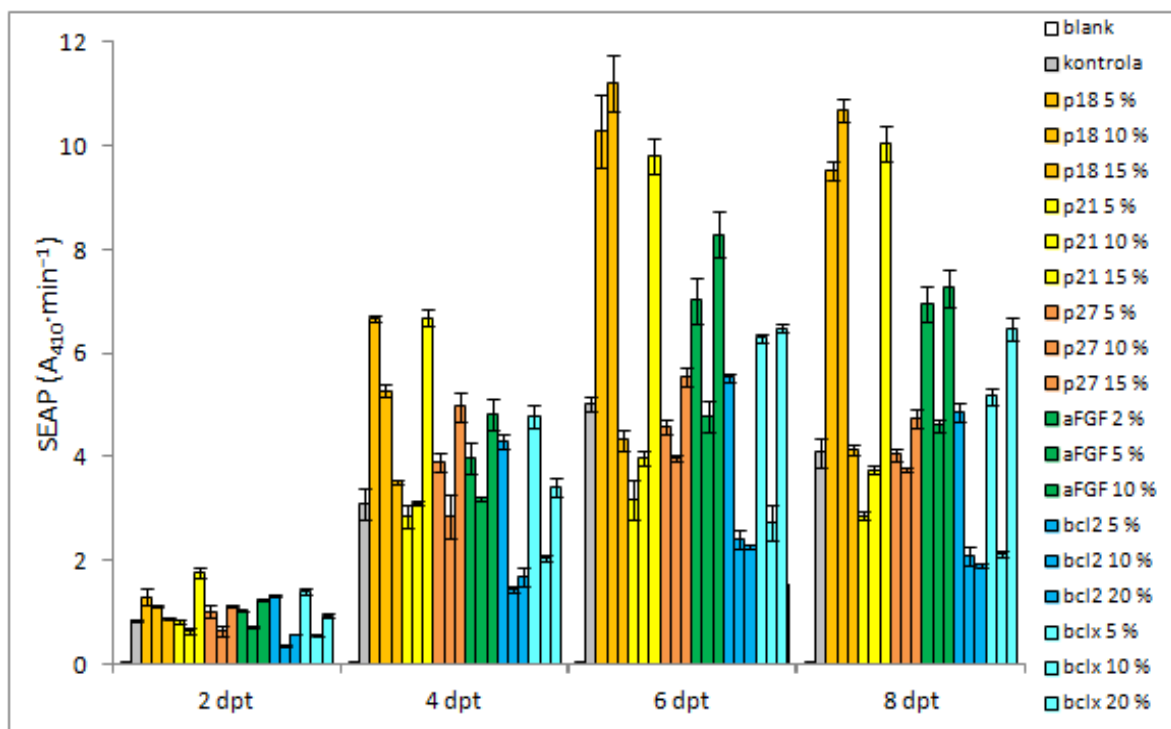


Obr. 5.6: Zkušební transfekce HEK293T buněk na 12jamkových destičkách pro optimalizaci poměru jednotlivých regulačních plazmidů.

Transfekce byla provedena v duplikátu na 12jamkových destičkách v objemu 1 ml o buněčné hustotě $20 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Transfekční směs obsahovala 40 µg DNA (80 % SEAP : GFP 19 : 1, 20 % pTT5 a pTW5-X) a 80 µg IPEI. Suspenze byla po 3,5 h zředěna na 2 ml o buněčné hustotě $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Každý sloupec reprezentuje průměr duplikátu 2 dny po transfekci.

Z grafu je patrné, že naměřené výsledky jsou poněkud podezřelé, neboť u některých podmínek nevidíme žádný trend v závislosti na vzrůstajícím množství. Množství GFP pozitivních buněk v jednotlivých podmínkách, včetně kontroly neobsahující žádnou regulační DNA, se pohybovala v rozmezí 30–43 %, což také vypovídá o nepříliš úspěšné transfekci. Byla proto provedena další zkušební transfekce v 24jamkových destičkách a 100ml hranatých lahvičkách s prodyšným víčkem, ve kterých jsou běžně kultivovány zásobní kultury HEK293 buněk. Pro transfekci bylo odebráno $400 \cdot 10^6$ buněk ze zásobní kultury, centrifugováno 5 min při $200 \times g$ a pelet resuspendován v čerstvém FreeStyle F17 médiu na buněčnou hustotu $20 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Suspenze byla poté rozdělena po 1 ml do jamek na sterilních 24jamkových destičkách. Poté byla do každé jamky přidána příslušná transfekční směs, která byla připravena způsobem uvedeným výše (Tab. 5.3, str. 47).

Destičky byly inkubovány 3,5 h při 135 RPM a 37 °C v 5% CO₂ atmosféře. Poté byla suspenze přenesena do sterilních 100ml hranatých lahvíček s prodyšným víčkem a zředěna 19 ml ExCELL293 média na buněčnou hustotu $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Následně byla měřena fluorescence GFP 2 dpt a aktivita SEAP 2, 4, 6 a 8 dpt (Obr. 5.7).



Obr. 5.7: Zkušební transfekce HEK293T buněk v 24jamkových destičkách a 100ml lahvíčkách pro optimalizaci poměru jednotlivých regulačních plazmidů.

Transfekce byla provedena na 24jamkových destičkách v objemu 1 ml o buněčné hustotě $20 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Transfekční směs obsahovala 40 μg DNA (80 % SEAP : GFP 19 : 1, 20 % pTT5 a pTW5-X) a 80 μg IPEI. Suspenze byla po 3,5 h zředěna na 20 ml o buněčné hustotě $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ do 100ml lahvíček s prodyšným víčkem. Každý sloupec reprezentuje průměr triplikátu měření SEAP 2, 4, 6 a 8 dní po transfekci.

Podíl GFP pozitivních buněk se opět pohyboval v rozmezí 14–48 %, což může vysvětlovat nízké výtěžky SEAP. Mimoto se opět u většiny regulačních genů nevyskytuje žádný trend v závislosti na jejich vzrůstajícím množství. Byla proto provedena transfekce ve 100ml hranatých lahvíčkách s prodyšným víčkem. Této nádobě musel být uzpůsoben objem buněk při transfekci na 10 ml, aby bylo zachováno přijatelné míchání buněk na třepačce a tudíž i buněčná hustota, neboť nebylo technicky možné připravit a zpracovat takové množství buněk (přibližně $4 \cdot 10^9$) potřebné pro přípravu 19 podmínek o objemu 10 ml a buněčné hustotě $20 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. V závislosti na buněčné hustotě bylo tedy nutné upravit i postup přípravy transfekční směsi.

5.1.5 Optimalizace poměru jednotlivých regulačních plazmidů vůči celkovému obsahu DNA v transfekční směsi

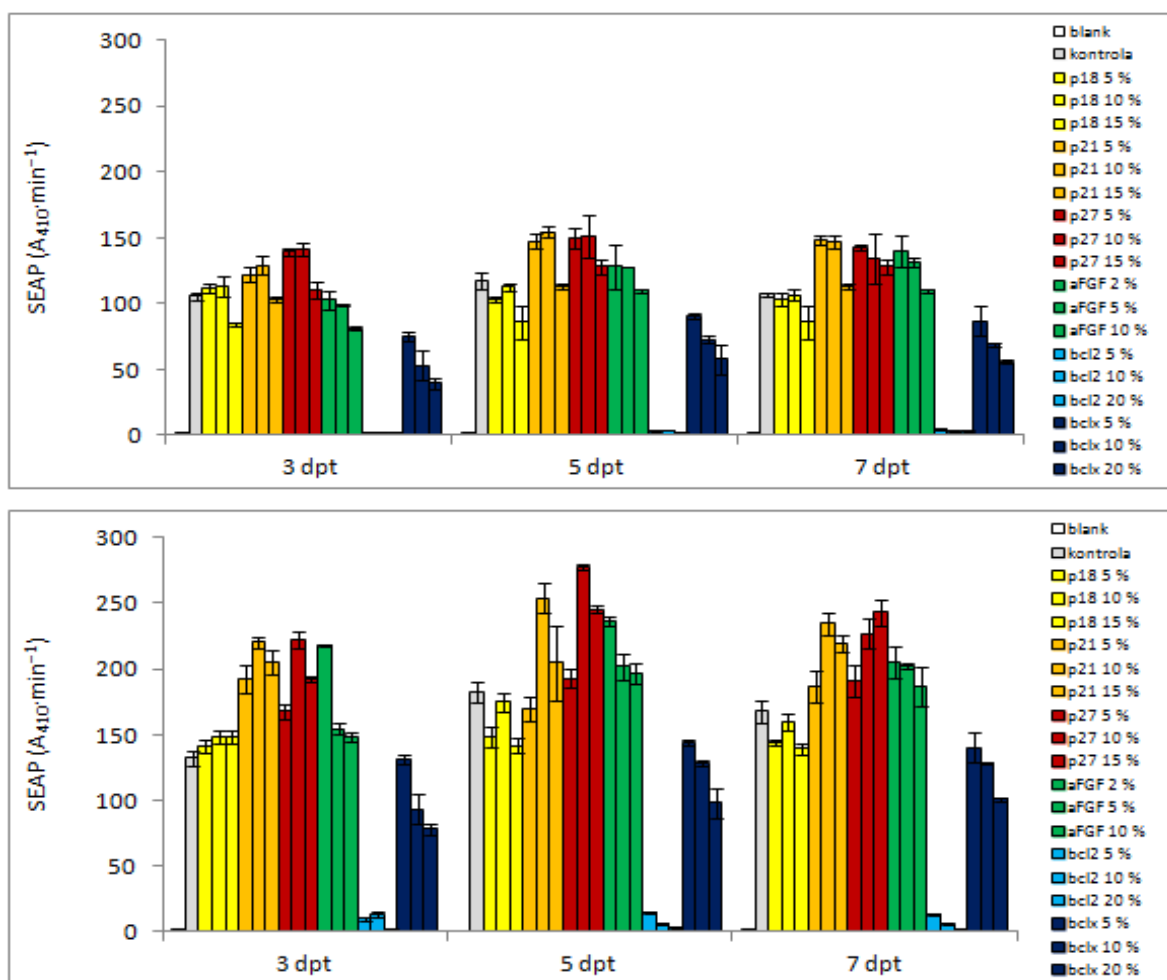
Pro transfekci bylo odebráno $400 \cdot 10^6$ buněk ze zásobní kultury, centrifugováno 5 min při $200 \times g$ a pelet resuspendován v čerstvém FreeStyle F17 médiu na buněčnou hustotu $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Suspenze byla poté rozdělena po 10 ml do sterilních 100ml hranatých lahvíček s prodyšným víčkem. Poté byl do každé lahvičky přidán 1 ml příslušné transfekční směsi inkubované při laboratorní teplotě 5 min od přidavku IPEI. Transfekční směs obsahovala 880 μl PBS-TK, do kterého byly následně přidány 2 μg DNA na $1 \cdot 10^6$ buněk a IPEI v poměru DNA : IPEI 1 : 2. Směs DNA obsahovala vždy 80 % směsi pTW5-GFP–pTW5-SEAP (1 : 19) a zbývajících 20 % tvořily různé poměry jednotlivých regulačních plazmidů a prázdného plazmidu pTT5 (Tab. 5.4).

Tab. 5.4: Použité objemy DNA a IPEI k přípravě transfekčních směsí pro tranzientní transfekci HEK293T buněk při optimalizaci poměru jednotlivých regulačních plazmidů.

Koncentrace všech plazmidů a IPEI byla $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Uvedené objemy byly pipetovány do 880 μl PBS-TK, aby byl výsledný objem směsi 1 ml. Po přidavku IPEI byly směsi inkubovány 5 min při laboratorní teplotě.

X	podíl pTW5-X	pTW5-GFP	pTW5-SEAP	pTW5-X	pTT5	IPEI
p18/p21/p27	5 %			2 μl	6 μl	
	10 %	1,6 μl	30,4 μl	4 μl	4 μl	80 μl
	15 %			6 μl	2 μl	
aFGF	2 %			0,8 μl	7,2 μl	
	5 %	1,6 μl	30,4 μl	2 μl	6 μl	80 μl
	10 %			4 μl	4 μl	
bcl2/bclx	5 %			2 μl	6 μl	
	10 %	1,6 μl	30,4 μl	4 μl	4 μl	80 μl
	20 %			8 μl	0 μl	
–	0 %	1,6 μl	30,4 μl	0 μl	8 μl	80 μl

Lahvičky byly inkubovány 3 h při 135 RPM a 37°C v 5% CO_2 atmosféře. Poté byla suspenze zředěna 10 ml ExCELL293 média na buněčnou hustotu $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Po 3 dnech byla měřena fluorescence GFP pro stanovení úspěšnosti transfekce. Aktivita SEAP byla měřena 3, 5 a 7 dpt pro stanovení výtěžku exprese proteinu (Obr. 5.8, str. 51). Tento pokus byl poté ještě jednou zopakován stejným způsobem.

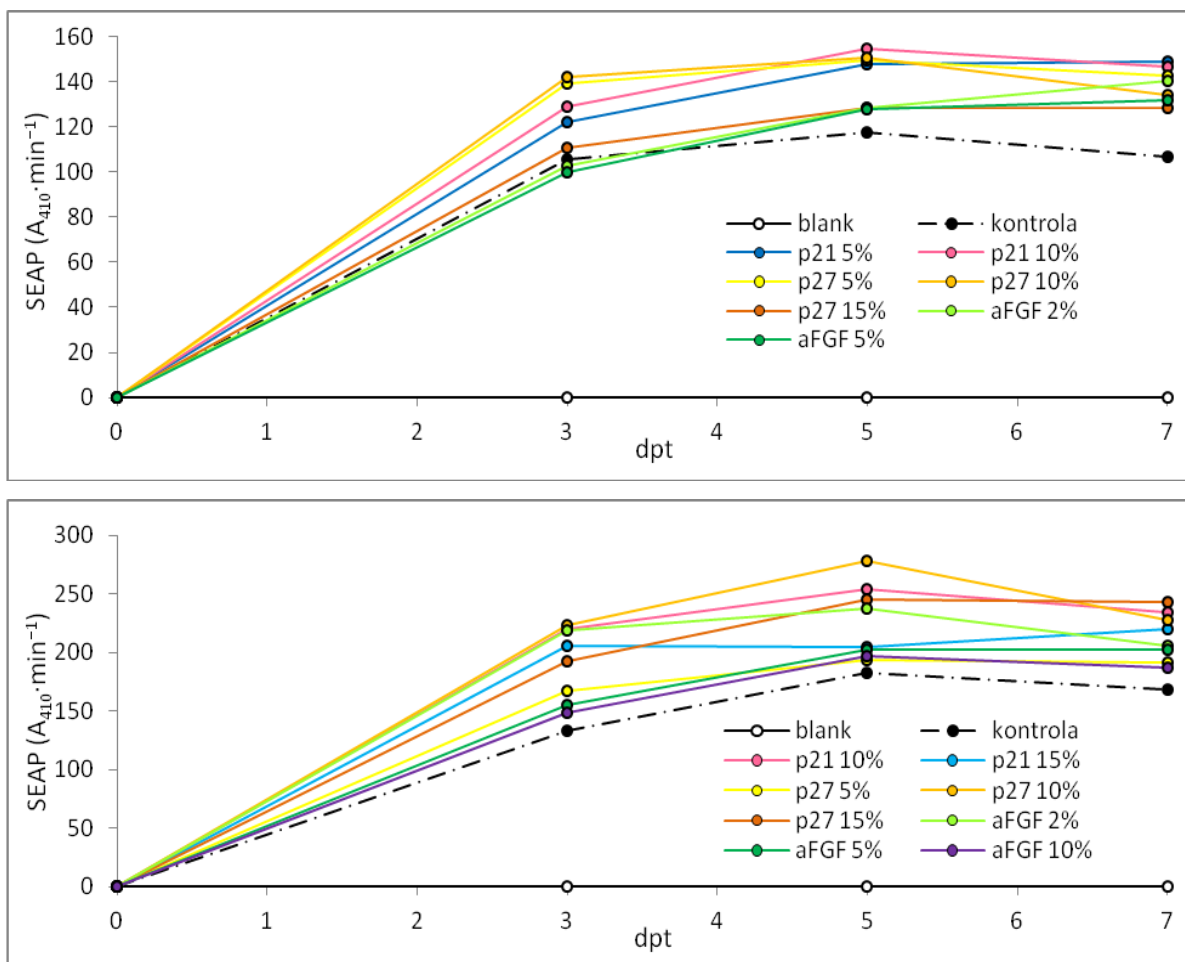


Obr. 5.8: Transfekce HEK293T buněk pro optimalizaci poměru jednotlivých regulačních plazmidů.

První (nahore) a druhá (dole) transfekce byla provedena v 100ml hranatých lahvčkách s prodyšným víčkem v objemu 10 ml o buněčné hustotě $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Transfekční směs o objemu 1 ml obsahovala 40 μg DNA (80 % SEAP : GFP 19 : 1, 20 % pTT5 a pTW5-X) a 80 μg IPEI. Suspenze byla po 3 h zředěna na 20 ml o buněčné hustotě $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Každý bod reprezentuje průměr triplikátu měření SEAP 3, 5 a 7 dní po transfekci.

Množství GFP pozitivních buněk se pohybovalo u první transfekce mezi 58–80 % a u druhé mezi 51–77 %, vyjma vzorků transfekovaných bcl-2, u kterých byla fluorescence z první transfekce 20–29 %, z druhé pak 11–32 %. Tuto skutečnost můžeme pozorovat i ve výsledcích měření aktivity SEAP. Zatímco všechny podmínky vykazují určitý trend exprese SEAP v závislosti na množství použité regulační DNA, vzorky transfekované bcl-2 téměř SEAP neexprimují. Proto byla změřena buněčná hustota všech podmínek pomocí hemocytometru 4 dpt. Zatímco viabilita bcl-2 vzorků byla na únosné mezi kolem 70 %, jejich buněčná hustota byla výrazně nižší ($<1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$) než u ostatních vzorků s regulačními geny, u kterých se viabilita pohybovala nad 80 % a buněčná hustota mezi $3\text{--}5 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$.

Největší pozitivní vliv na expresi měly především geny pro inhibitory CDK (p18, p21, p27) a růstový faktor aFGF. Naopak antiapoptotické geny měly na expresi výrazně negativní dopad. Z podmínek s pozitivním vlivem na expresi (Obr. 5.9) byly následně vybrány nejlepší poměry jednotlivých regulačních genů, tedy 10% množství inhibitoru CDK (p18/p21/p27), 2% množství aFGF a 5% množství regulátoru apoptózy (bcl-2/bcl-x).



Obr. 5.9: Jednotlivé podmínky zvyšující expresi SEAP jako modelového proteinu.

Během obou měření vykazovaly podmínky obsahující regulační geny p21, p27 či aFGF zvýšenou expresi SEAP, především pak podmínky s obsahem 10% p21, 5%/10%/15% p27, 2%/5% aFGF.

Optimalizované podmínky, které byly použity pro další testy je použití 100ml hranatých lahvíček s prodyšným víčkem jakožto transfekčních nádob, buněčná hustota $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ve FreeStyle F17 médiu při transfekci a $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ po zředění ExCELL293 médiem, použité množství DNA v transfekční směsi 2 μg na $1 \cdot 10^6$ buněk, přičemž DNA směs obsahuje 10 % p18/p21/p27, 2 % aFGF či 5 % bcl-2/bcl-x a současně směs SEAP a GFP v poměru 19 : 1. Další podmínkou je poměr DNA : IPEI 1 : 2, tzn. 4 μg IPEI na $1 \cdot 10^6$ buněk.

5.1.6 Optimalizace poměru regulačních plazmidů ve vzájemné kombinaci vůči celkovému obsahu DNA v transfekční směsi

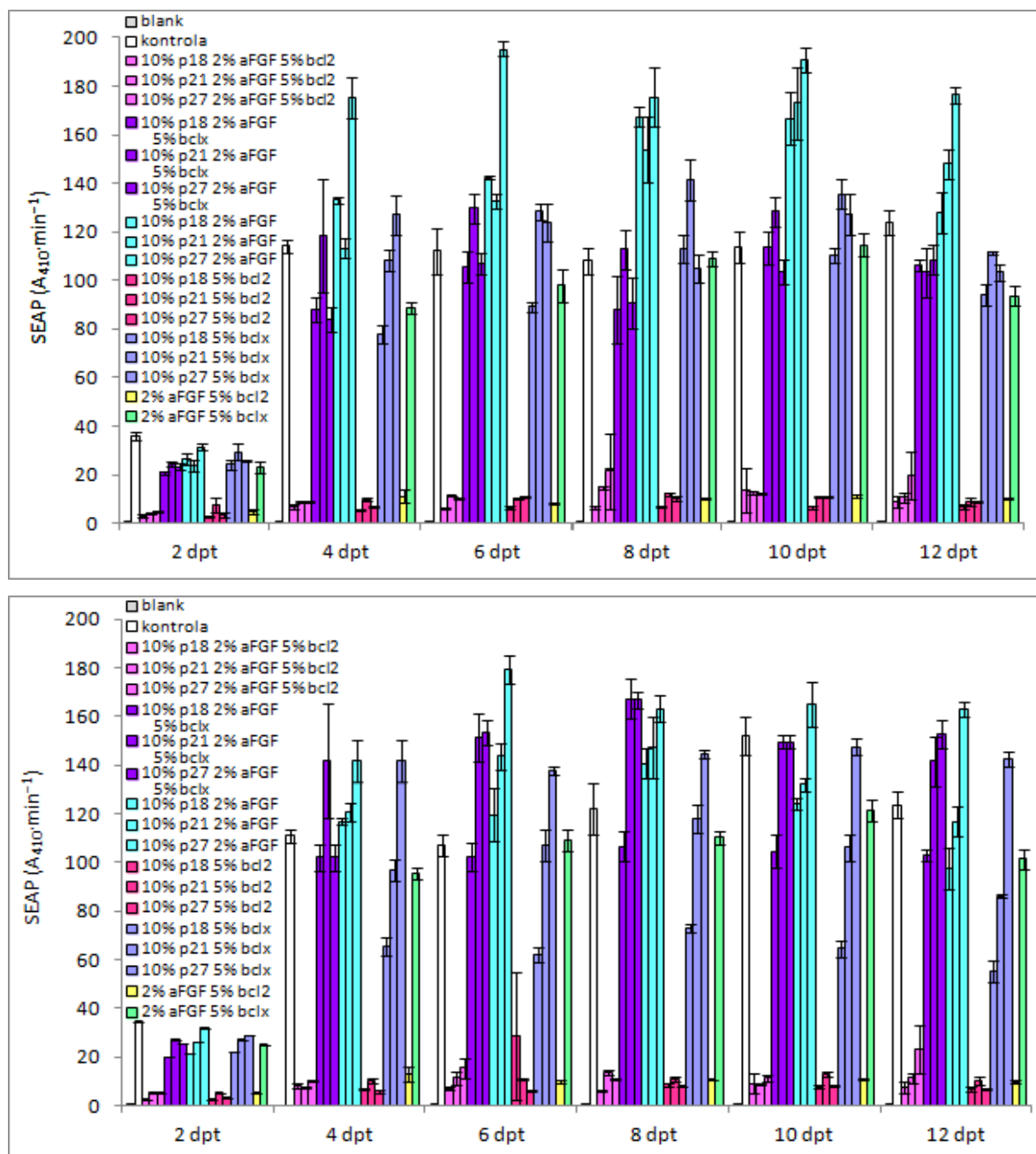
Transfekce byla provedena stejným postupem jako v pododdíle 5.1.5. Lišila se pouze složení směsi DNA v transfekčních směsích, obsahující 83 % směsi GFP a SEAP v poměru 1 : 19 a zbývajících 17 % tvořily různé poměry kombinovaných regulačních plazmidů a prázdného plazmidu pTT5 (Tab. 5.5).

Tab. 5.5: Použité objemy DNA a IPEI k přípravě transfekčních směsí pro tranzientní transfekci HEK293T buněk při optimalizaci poměru regulačních plazmidů v kombinaci.

Koncentrace všech použitých DNA a IPEI byla $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Směs SEAP a GFP byla připravena v poměru 19 : 1. Uvedené objemy byly pipetovány do 880 μl PBS-TK, aby byl výsledný objem směsi 1 ml. Po přidavku IPEI byly směsi inkubovány 5 min při laboratorní teplotě.

podmínka	pTW5-						-GFP	pTT5 (μl)	IPEI (μl)
	-p18 (μl)	-p21 (μl)	-p27 (μl)	-aFGF (μl)	-bcl2 (μl)	-bclx (μl)	-SEAP (μl)		
p18/aFGF	4	—	—	0,8	—	—	33,2	2	80
p18/bcl2	4	—	—	—	2	—		0,8	
p18/bclx	4	—	—	—	—	2		0,8	
p18/aFGF/bcl2	4	—	—	0,8	2	—		0	
p18/aFGF/bclx	4	—	—	0,8	—	2		0	
p21/aFGF	—	4	—	0,8	—	—		2	
p21/bcl2	—	4	—	—	2	—		0,8	
p21/bclx	—	4	—	—	—	2		0,8	
p21/aFGF/bcl2	—	4	—	0,8	2	—		0	
p21/aFGF/bclx	—	4	—	0,8	—	2		0	
p27/aFGF	—	—	4	0,8	—	—	33,2	2	80
p27/bcl2	—	—	4	—	2	—		0,8	
p27/bclx	—	—	4	—	—	2		0,8	
p27/aFGF/bcl2	—	—	4	0,8	2	—		0	
p27/aFGF/bclx	—	—	4	0,8	—	2		0	
aFGF/bcl2	—	—	—	0,8	2	—		4	
aFGF/bclx	—	—	—	0,8	—	2		4	
kontrola	—	—	—	—	—	—		6,8	

Lahvičky byly inkubovány 3 h v inkubátoru při 135 RPM a 37 °C v 5% CO₂ atmosféře. Poté byla suspenze zředěna 10 ml ExCELL293 média na buněčnou hustotu $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Fluorescence GFP byla měřena 2 dpt, aktivita SEAP 2, 4, 6, 8, 10 a 12 dpt (Obr. 5.10). Tento pokus byl poté ještě jednou zopakován stejným způsobem.

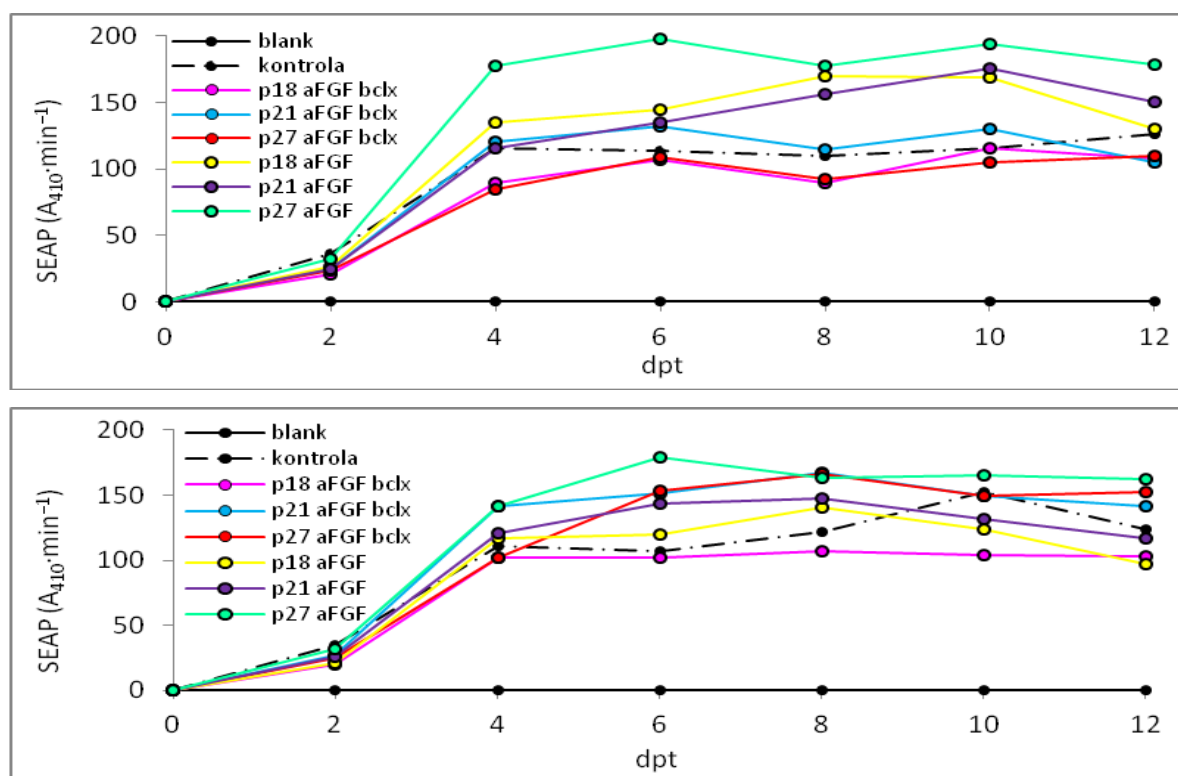


Obr. 5.10: Transfekce HEK293T buněk kombinací regulačních plazmidů.

První (nahore) a druhá (dole) transfekce byla provedena v 100ml hranatých lahvičkách s prodyšným víčkem v objemu 10 ml o buněčné hustotě $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Transfekční směs o objemu 1 ml obsahovala 40 µg DNA (83 % SEAP : GFP 19 : 1, 17 % pTT5 a pTW5-X) a 80 µg IPEI. Suspenze byla po 3 h zředěna na 20 ml o buněčné hustotě $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Každý bod reprezentuje průměr triplikátu měření SEAP 2, 4, 6, 8, 10 a 12 dní po transfekci.

GFP pozitivní buňky tvořily u první transfekce 48–70 % populace a u druhé mezi 47–79 % populace, vyjma vzorků kotransfekovaných bcl-2, u kterých bylo množství těchto buněk opět velmi nízké (první transfekce 26–48 %, druhá transfekce 21–42 %). Tuto skutečnost opět můžeme pozorovat i ve výsledcích měření aktivity SEAP, neboť vzorky kotransfekované bcl-2 téměř SEAP neexprimují. Byla opět změřena buněčná hustota všech podmínek pomocí hemocytometru 3 dpt. Zatímco viabilita vzorků s bcl-2 byla na únosné mezi kolem 80 %, jejich buněčná hustota byla výrazně nižší ($<0,5 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$) než u ostatních vzorků s regulačními geny ($1\text{--}3 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$).

Pozitivní vliv na expresi měly kombinace genů pro inhibitory CDK (p18, p21, p27) s růstovým faktorem aFGF (Obr. 5.11). Tyto kombinace genů s antiapoptotickým bcl-x by mohly mít na expresi také vliv, především v delším kultivačním čase (Obr. 5.11).

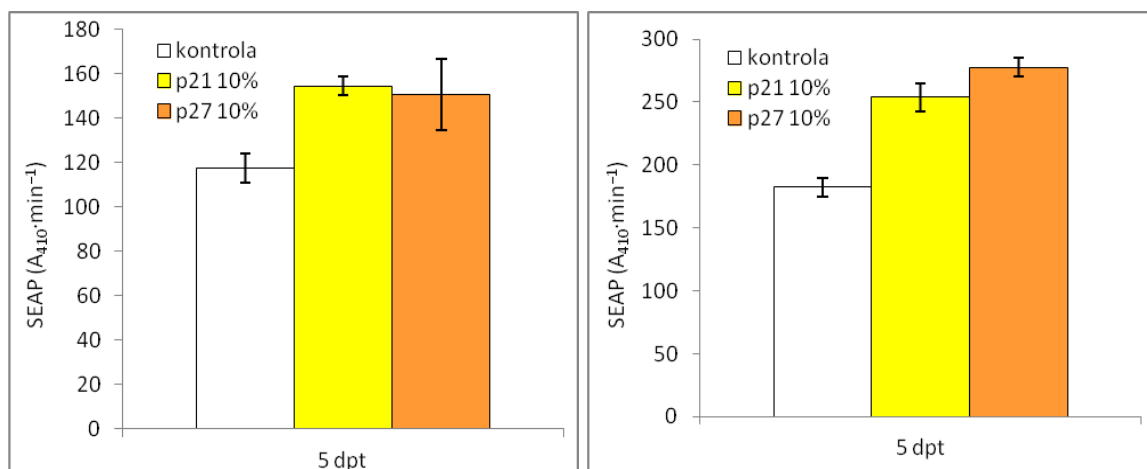


Obr. 5.11: Vliv kombinace inhibitorů CDK, aFGF a bcl-x na expresi SEAP.

Během obou měření vykazovaly podmínky obsahující kombinace regulačních genů p18/p21/p27 a aFGF zvýšenou expresi SEAP, především pak podmínka s obsahem 10% p27, 2% aFGF.

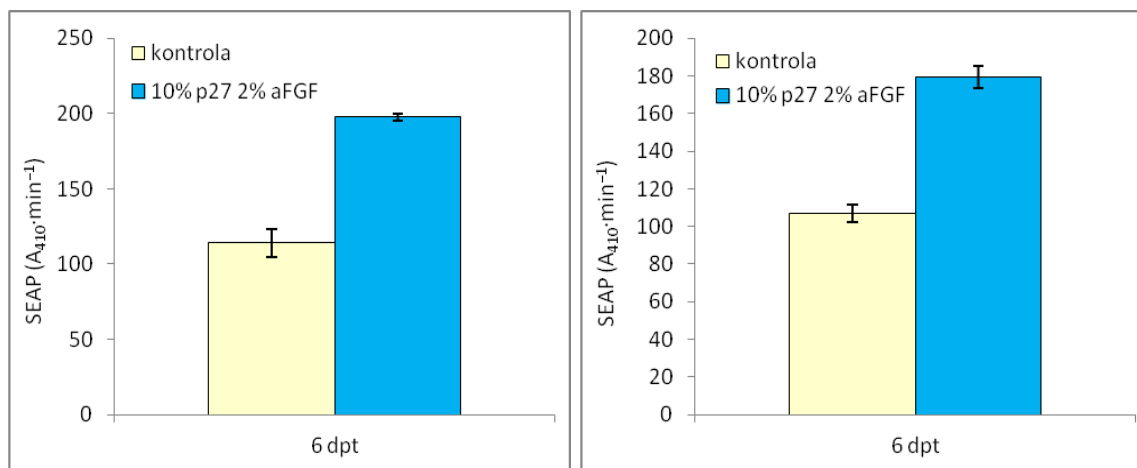
Zatímco při optimalizaci exprese regulací poměru jediného regulačního genu měla největší přínos 10% koexprese p21 (zvýšení exprese o 32 %, resp. 39 %) a 10% koexprese p27 (zvýšení exprese o 28 %, resp. 52 %), což potvrdila obě měření (Obr. 5.12, str. 56), při optimalizaci exprese prostřednictvím kombinací optimalizovaných množství regulačních

genů vyšla jako nejprínosnější kombinace 10% p27 a 2% aFGF (zvýšení exprese o 68 %, resp. 74 %), taktéž potvrzena oběma měřeními (Obr. 5.13).



Obr. 5.12: Srovnání výtěžku exprese SEAP 5 dní po transfekci při koexpresi 10 % pTW5-p21 či 10 % pTW5-p27.

První (vlevo) a druhá (vpravo) transfekce byla provedena v 100ml hranatých lahvičkách s prodyšným víčkem v objemu 10 ml o buněčné hustotě $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Transfekční směs o objemu 1 ml obsahovala 40 μg DNA (kontrola: 80 % SEAP : GFP 19 : 1, 20 % pTT5; p21 10%: 80 % SEAP : GFP 19 : 1, 10 % pTW5-p21, 10 % pTT5; p27 10%: 80 % SEAP : GFP 19 : 1, 10 % pTW5-p27, 10 % pTT5) a 80 μg IPEI. Suspenze byla po 3 h zředěna na 20 ml o buněčné hustotě $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Každý bod reprezentuje průměr triplikátu 5 dní po transfekci.



Obr. 5.13: Srovnání výtěžku exprese SEAP 6 dní po transfekci při koexpresi 10 % pTW5-p27 a 2 % pTW5-aFGF.

První (vlevo) a druhá (vpravo) transfekce byla provedena v 100ml hranatých lahvičkách s prodyšným víčkem v objemu 10 ml o buněčné hustotě $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Transfekční směs o objemu 1 ml obsahovala 40 μg DNA (kontrola: 83 % SEAP : GFP 19 : 1, 17 % pTT5; p27 10% aFGF 2%: 83 % SEAP : GFP 19 : 1, 10 % pTW5-p21, 2 % pTW5-aFGF, 5 % pTT5) a 80 μg IPEI. Suspenze byla po 3 h zředěna na 20 ml o buněčné hustotě $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Každý bod reprezentuje průměr triplikátu měření SEAP 6 dní po transfekci.

6 Diskuze

Jedním z cílů této práce bylo připravit zásobní roztoky plazmidových DNA – šesti plazmidů s regulačními geny, jednoho prázdného plazmidu a dvou plazmidů s reportérovými geny. Regulační plazmidy obsahovaly buďto gen pro inhibitor CDK (p18, p21 či p27), který zastavuje buňku v G₁ fázi a zabraňuje tak buněčnému dělení [17,18,51], nebo gen pro růstový faktor (aFGF) regulující proliferaci, vitalitu a růst buněk [17,57], anebo gen pro inhibitor apoptózy (bcl-2 či bcl-x), které zabraňují vylití cytochromu *c* z mitochondrií do cytozolu [93]. Jako kontrolní prázdný plazmid byl používán pTT5 [14]. Tento plazmid byl totiž použit pro přípravu vektoru pTW5, ze kterého byly následně připraveny všechny regulační i reportérové plazmidy [114]. Reportérové plazmidy byly připraveny PCR amplifikací jednotlivých fragmentů GFP a SEAP, které byly následně s pomocí restrikčních endonukleáz vloženy do již připraveného pTW5 vektoru.

Amplifikovaný fragment SEAP však obsahoval navíc nukleotidový triplet CTG kódující leucin. Tento triplet se nacházel v části sekrečního signálu, který obsahuje sedm leucinů. Po provedení transfekčního testu bylo potvrzeno, že leucin, který byl v amplifikovaném fragmentu SEAP navíc, nemá na účinnost transfekce či výtěžek exprese vliv a vytvořený plazmid pTW5-SEAP byl proto dále používán. Sekreční signál SEAP se nachází přímo za startovním kodonem. Přímý primer pro PCR amplifikaci tohoto fragmentu proto obsahoval část sekvence sekrečního signálu. Kombinace určité teploty nasedání primeru při PCR amplifikaci a jeho nukleotidové sekvence tak mohla skutečně zapříčinit prodloužení fragmentu, neboť přímý primer nenasedl celý. Teplotu nasedání však nebylo možné zvýšit vzhledem k reverznímu primeru použitému při této PCR amplifikaci.

Po přípravě veškerých zásobních roztoků plazmidových DNA byly provedeny první optimalizační experimenty. První série optimalizačních testů byla však neúspěšná. Výtěžek SEAP i podíl GFP pozitivních buněk byl nízký až nulový a nebylo možné na základě těchto výsledků pokračovat stejným způsobem v optimalizačních testech dál. V rámci změn různých parametrů pro překonání tohoto problému byla provedena kontrola stavu roztoků plazmidových DNA na agarózové elektroforéze. Bylo zjištěno, že během opakovaného rozmrazování a zmrazování těchto roztoků jejich DNA degradovala. Tato degradace mohla být způsobena nedostatečnou čistotou plazmidu, např. přítomností DNáz, které DNA při každém rozmražení štěpily. Proto byly připraveny nové zásobní roztoky

DNA v TE pufru, který díky obsahu EDTA inhibuje enzymovou aktivitu DNA modifikujících enzymů a zabraňuje tak štěpení DNA. Dále byl tento zásobní roztok rozdělen do několika sterilních mikrozkušavek, hluboce zmrazen a uchováván při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby nebyl roztok vystaven zbytečnému rozmrazování.

Následně byla provedena transfekce pro porovnání vlivu vektoru pTT5 a pTW5 na expresní systém HEK293T buněčné linie. Transfekce byla provedena podle obvyklého protokolu při buněčné hustotě $1 \cdot 10^6\text{ ml}^{-1}$ prostřednictvím IPEI za použití $1\text{ }\mu\text{g}$ DNA na $1 \cdot 10^6$ buněk (poměr SEAP : GFP 19 : 1 [14]). Množství IPEI se v rámci jednotlivých podmínek pohybovalo mezi $1\text{--}5\text{ }\mu\text{g}$ na $1 \cdot 10^6$ buněk. Transfekce byla úspěšná, avšak bohužel však neprokázala žádné pozitivní účinky použití vektoru pTW5 na výtěžek exprese SEAP. To může být zapříčiněno použitím jiné buněčné linie. Sekvence WPRE, replikační počátek oriP a další vložené regulační sekvence (taktéž obsažené v plazmidu pTW5) byly testovány pro své pozitivní účinky na výtěžek exprese proteinu v tranzientně transfekovaných buňkách HEK293E [18]. V této buněčné linii se dále uplatňuje replikační počátek oriP, který umožní epizomální replikaci plazmidu uvnitř buňky a vliv všech dalších parametrů je tak podpořen [12,13]. Měření dokonce vykazovala snížení výtěžku produkce tohoto proteinu o jednotky % při použití vektoru pTW5. V obou případech, tedy při použití pTT5 či pTW5 vektoru, však byl za těchto transfekčních podmínek potvrzen optimální poměr DNA : IPEI = 1 : 3.

První optimalizovaným parametrem tak byl poměr DNA : IPEI pro zavedení protokolu vysokohustotní transfekce regulačními geny a celkově větším množstvím DNA [17,18]. Tento poměr je totiž zásadní pro vznik kladně nabitého transfekčního komplexu, který umožňuje vnesení DNA do buňky. Pro tuto transfekci HEK293T buněk při buněčné hustotě $20 \cdot 10^6\text{ ml}^{-1}$ za použití $2\text{ }\mu\text{g}$ DNA na $1 \cdot 10^6$ buněk bylo optimální množství IPEI $4\text{ }\mu\text{g}$ na $1 \cdot 10^6$ buněk, tedy poměr DNA : IPEI 1 : 2. Výtěžky SEAP byly však kriticky nízké a množství GFP pozitivních buněk rovněž nulové. Tento neúspěch jsem přisoudila použití transfekční nádoby – 50ml zkumavce s kónickým dnem a prodyšným uzávěrem – neboť právě její kónické dno způsobovalo špatné míchání buněčné suspenze a sedimentaci buněk na dně zkumavky vedoucí k vysoké úmrtnosti. Tuto skutečnost nebylo možné překonat ani snížením celkového objemu buněčné suspenze ani zvýšením otáček třepačky.

Bylo proto nezbytné změnit nádobu, ve které byly buňky transfekovány a následně kultivovány. Nejprve byly použity 12jamkové destičky, ve kterých byla provedena předchozí transfekce pro porovnání vlivu pTT5 a pTW5 vektoru. Byly však zachovány

stejně podmínky vysokohustotní transfekce, tedy buněčná hustota při transfekci $20 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$, poměr DNA : IPEI 1 : 2 a množství DNA $2 \mu\text{g}$ na $1 \cdot 10^6$ buněk. Měření však opět poukazovalo na neúspěšnou transfekci, neboť fluorescence GFP byla opět nízká. Tento problém mohl nastat právě kvůli vysoké hustotě buněčné suspenze, která se na 12jamkových destičkách dostatečně nemíchá a buňky tak sedimentují, resp. se shlukují ve středu jamek. Při vyšších otáčkách však hrozí opačný problém, tedy ulpívání buněk na stěnách jamek, vedoucí k dalšímu zatížení získaných výsledků. Dalším problémem byla také různá míra vysychání suspenze způsobená nedoléhajícími víčky destiček. Byl proto proveden další test transfekce v 24jamkových destičkách s menším poloměrem jamek. Buněčná suspenze byla následně zředěna do 100ml hranatých lahvíček s prodyšným víčkem, které jsou používány pro kultivaci zásobní kultury HEK293T buněk a bylo tak zamezeno vysychání suspenze transfekovaných buněk. Po vyhodnocení naměřených výsledků tohoto testu však bylo zjištěno, že transfekce byla opět neúspěšná, pravděpodobně kvůli 24jamkové destičce, ve které buňky stále sedimentovaly.

Pro transfekci tak byly použity pouze 100ml hranaté lahvičky. Vzhledem k jejich velikosti tak musel být upraven i objem buněčné suspenze při transfekci na 10 ml. Z ekonomického i technického hlediska nebylo možné provádět 19podmínkové optimalizační experimenty, při kterých obsahuje každá lahvička $200 \cdot 10^6$ buněk. Byla proto změněna buněčná hustota suspenze na $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Následně musel být upraven postup při přípravě transfekční směsi, přičemž vyšší množství DNA $2 \mu\text{g}$ na $1 \cdot 10^6$ buněk i optimalizované množství IPEI $4 \mu\text{g}$ na $1 \cdot 10^6$ buněk zůstalo zachováno. Zatímco při vysokohustotní transfekci byla směs po přidavku IPEI pouze promíchána a ihned přidána k buněčné suspenzi, tato transfekční směs byla připravena ve větším objemu (1 ml) a koncentrace DNA a IPEI v této směsi tak byly relativně nízké. Transfekční směs byla proto inkubována 5 min při laboratorní teplotě po přidavku IPEI, aby došlo k vytvoření transfekčního komplexu.

Pro optimalizaci množství jednotlivých regulačních plazmidů byly provedeny dvě transfekce. Vzhledem k příliš malému množství 100ml lahviček byly oba transfekční testy provedeny zvlášť a tudíž z jiné generace buněk HEK293T. Tato skutečnost je zřejmá z porovnání jednotlivých měření, kdy se jednotlivé výtěžky SEAP ze stejných podmínek liší, avšak trend vůči ostatním podmínkám zůstává stejný. Jednotlivé podmínky – množství regulačních genů p18, p21, p27 a aFGF pro kotransfekci HEK293T buněk – byly voleny na základě dřívějších expresních testů v HEK293E buňkách [17,18], zatímco množství regulačních genů bcl-2 a bcl-x byla zvolena náhodně. Největší zvýšení výtěžku

poskytovaly podle očekávání inhibitory buněčného cyklu, tedy podmínky obsahující pTW5-p18, pTW5-p21 a pTW5-p27. U všech tří regulátorů se taktéž vyskytoval stejný trend při porovnání podmínek jejich různých množství. Se vzrůstajícím množstvím inhibitoru CDK se zvyšovala míra exprese SEAP. Nejvyššího zlepšení tak bylo dosaženo při použití 10% množství regulačních genů p18, p21 či p27. Při použití vyššího množství se exprese SEAP opět snižovala. Pozitivní vliv na expresi SEAP mělo také použití pTW5-aFGF. Jeho nejnížší množství – 2 % z celkové směsi DNA – vykazovalo největší zlepšení výtěžku SEAP a se zvyšujícím se množstvím aFGF tak opět exprese klesala. Velkým zklamáním byly antiapoptotické geny bcl-2 a bcl-x. Žádná z podmínek neposkytla zlepšení exprese SEAP, naopak výtěžek exprese ještě snižovaly. Nejnížší 5% množství regulačního genu bcl-x vykazovalo nejnížší negativní vliv, bylo by tak možné uvažovat o dalších optimalizačních testech za použití ještě nižších množství bcl-x. V případě bcl-2 se však nabízí jiné vysvětlení. Při tranzientní transfekci buněk genem bcl-2 se jeho strategie ochránáře mění v zabijáka. Je za to zodpovědná kaspáza 3, která štěpí bcl-2 na molekulu podobnou proteinu Bax, který apoptózu podporuje [115–117]. Přesto byly pro další optimalizační experimenty použity i nadále, konkrétně množství s nejnížším negativním vlivem na expresi SEAP, tedy 5% množství celkové směsi DNA.

V dalším optimalizačním testu byl pozorován vliv kombinací těchto optimálních množství regulačních genů. Opět byly provedeny dvě transfekce, každá z jiné buněčné generace. Trend vlivů jednotlivých podmínek na expresi byl opět porovnatelný v obou měřeních, včetně účinnosti transfekce – fluorescence GFP byla detekována v nadpolovičním množství buněk. Jedinou výjimkou byly opět podmínky kotransfekce genem bcl-2, v nichž byl podíl GFP pozitivních buněk přibližně 30 %, obdobně jako v předchozím optimalizačním experimentu. Buněčná hustota 3–4 dny po transfekci byla také neočekávaně nízká, zatímco viabilita byla porovnatelná s ostatními podmínkami. Bylo tak potvrzeno proapoptotické chování genu bcl-2 při tranzientní transfekci [115–117], který ihned po transfekci indukuje apoptózu v buňkách, do kterých byla pTW5-bcl2 dopravena. Několik dní po transfekci by tak již mrtvé buňky nebyly přítomné a viabilita by proto odpovídala ostatním podmínkám, zatímco buněčná hustota nikoliv.

Největší zvýšení výtěžku SEAP z těchto optimalizačních podmínek poskytly kombinace 10% množství inhibitorů CDK a 2% množství růstového faktoru. Při porovnání obou optimalizačních experimentů – vlivů jednotlivých regulačních plazmidů s vlivy kombinací těchto plazmidů – nemohou být opět porovnávány absolutní hodnoty výtěžku exprese, neboť ve všech experimentech byly použity pokaždé jiné generace HEK293T

buněk. Míra zvýšení exprese proteinu tak byla porovnána na základě relativních hodnot exprese, které byly vztaženy ke kontrolnímu vzorku každého testu, obsahujícího pouze SEAP, GFP a dané množství prázdného plazmidu pTT5. Z toho porovnání je pak patrné, že největším přínosem pro tranzientní transfekci je kombinace 10% množství pTW5-p27 a 2% množství pTW5-aFGF, které zvyšuje expresi genu až o 74 %. Dalšími signifikantními podmínkami také může být transfekce 10% množstvím pTW5-p21 či pTW5-p27. Tyto inhibitory CDK totiž zvyšují expresi genu až o 39 %, resp. 52 %.

Kombinace s antiapoptotickými geny, především pak kombinace inhibitoru CDK, růstového faktoru aFGF a genu bcl-x, zpočátku snižovaly míru exprese, avšak v delším kultivačním čase, konkrétně od osmého dne po transfekci, se výtěžek exprese začal zvyšovat. Tranzientní kotransfekce antiapoptotických genů však neposkytuje takové zlepšení výtěžku exprese genu jako při tranzientní transfekci buněk stabilně transfekovaných antiapoptotickými geny [23,24]. Nasnadě je také otázka, proč nebyly testovány kombinace genů pro p21 a p27, vzhledem k jejich nejvyšší účinnosti na zvýšení exprese. Tyto dva inhibitory CDK mají však v buněčném cyklu tutéž funkci (Obr. 1.2, str. 14), a to inhibici komplexu CDK 2–cyklin E. Kombinace 10% množství pTW5-p21 a 10% množství pTW5-p27 by tak mohla působit jako 20% množství jediného inhibitoru. Vzhledem ke snižujícímu se účinku inhibitoru na expresi již při množství 15 % z celkové DNA je tak pravděpodobné, že by kombinace těchto dvou inhibitorů CDK byla kontraproduktivní.

Na druhou stranu by bylo možné uvažovat o kombinaci 5% množství pTW5-p21 a 5% množství pTW5-p27. Rovněž by bylo potenciálně zajímavé vyzkoušet obdobnou kombinaci ostatních inhibitorů CDK, např. pTW5-p18 a pTW5-p21 [18], resp. pTW5-p18 a pTW5-p27, neboť p18 inhibuje komplex CDK 4/6–cyklin D (Obr. 1.2, str. 14). Tyto experimenty tak mohou představovat další kroky v optimalizaci expresního systému HEK293T buněčné linie.

7 Shrnutí

Byly optimalizovány podmínky tranzientní transfekce HEK293T buněčné linie za použití regulačních genů jednotlivě i v kombinaci. Největší zlepšení exprese genu – až o 74 % – poskytly tyto podmínky:

- buněčná hustota při transfekci $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$
- množství DNA v transfekční směsi: 2 μg směsi DNA na $1 \cdot 10^6$ buněk
 - 10 % směsi DNA: pTW5-p27
 - 2 % směsi DNA: pTW5-aFGF
 - 88 % směsi DNA: SEAP a GFP v poměru 19 : 1
- poměr DNA : IPEI = 1 : 2, tzn. 4 μg IPEI na $1 \cdot 10^6$ buněk
- po 3 h zředění suspenze na buněčnou hustotu $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$
- použitá média: FreeStyle F17 a ExCELL293
- použitá nádoba pro transfekci a produkci: skleněná sterilní 100ml hranatá lahvička s prodyšným víčkem

8 Seznam použité literatury

- [1] J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Hudson, J. R. Wortman *et al*: Science 291, 1304–1351 (2001)
- [2] M. K. Ghazavi, G. A. Johnston: Clin. Dermatol. 29, 300–305 (2011)
- [3] A. M. Sinclair, S. Elliott: J. Pharm. Sci. 94, 1626–1635 (2005)
- [4] G. Walsh, R. Jefferis: Nat. Biotechnol. 24, 1241–1252 (2006)
- [5] L. Baldi, D. L. Hacker, M. Adam, F. M. Wurm: Biotechnol. Lett. 29, 677–684 (2007)
- [6] A. R. Aricescu, W. Lu, E. Y. Jones: Acta Cryst. D. 62, 1243–1250 (2006)
- [7] S. Geisse, M. Henke: J. Struct. Funct. Genomics 6, 165–170 (2005)
- [8] S. Geisse, M. Jordan, F. M. Wurm: Methods Mol. Biol. 308, 87–98 (2005)
- [9] P. Thomas, T. G. Smart: J. Pharmacol. Toxicol. Methods 51, 187–200 (2005)
- [10] A. van der Eb: Transcript of Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting, USFDA CTR For Biologics Evaluation and Research, 77–100 (2001)
- [11] F. L. Graham, J. Smiley, W. C. Russell, R. Nairn: J. Gen Virol. 36, 59–74 (1977)
- [12] K. Van Craenenbroeck, P. Vanhoenacker, G. Haegeman: Eur. J. Biochem. 267, 5667–5678 (2000)
- [13] X. Sun, P. E. Goh, K. T. Wong, T. Mori, M. G. Yap: Biotechnol. Lett. 28, 843–848 (2006)
- [14] Y. Durocher, S. Perret, A. Kamen: Nucleic Acids Res. 30, e9 (2002)
- [15] S. Chaudhary, J. E. Pak, B. P. Pedersen, L. J. Bang, L. B. Zhang, S. M. Ngaw, R. G. Green, V. Sharma, R. M. Stroud: Methods 55, 273–280 (2011)
- [16] S. Chaudhary, J. E. Pak, F. Gruswitz, V. Sharma, R. M. Stroud: Nat. Protoc. 7, 453–466 (2012)
- [17] G. Backliwal, M. Hildinger, S. Chenuet, S. Wulhfard, M. De Jesus, F. M. Wurm: New Biotechnol. 25, 162–166 (2008)
- [18] G. Backliwal, M. Hildinger, S. Chenuet, M. De Jesus, F. M. Wurm: Nucleic Acids Res. 36, e96 (2008)
- [19] F. M. Wurm, A. Bernard: Curr. Opin. Biotechnol. 10, 156–159 (1999)
- [20] E. Carpentier, S. Paris, A. Kamen, Y. Durocher: J. Biotechnol. 128, 268–280 (2007)

-
- [21] F. M. Wurm: *Nat. Biotechnol.* 22, 1393–1398 (2004)
- [22] G. Backliwal, M. Hildinger, V. Hasija, F. M. Wurm: *Biotechnol. Bioeng.* 99, 721–727 (2008)
- [23] N. S. Kim, G. M. Lee: *Biotechnol. Bioeng.* 71, 184–193 (2000–2001)
- [24] B. S. Majors, M. J. Betenbaugh, N. E. Pederson, G. G. Chiang: *Biotechnol. Bioeng.* 101, 567–578 (2008)
- [25] C. M. Gorman, B. H. Howard, R. Reeves: *Nucleic Acids Res.* 11, 7631–7648 (1983)
- [26] G. Backliwal, M. Hildinger, I. Kuettel, F. Delegrange, D. L. Hacker, F. M. Wurm: *Biotechnol. Bioeng.* 101, 182–189 (2008)
- [27] G. Chen, P. X. Yuan, Y. M. Jiang, L. D. Huang, H. K. Manji: *Brain Res. Mol. Brain Res.* 64, 52–58 (1999)
- [28] M. Derouazi, P. Girard, F. Van Tilborgh, K. Iglesias, N. Muller, M. Bertschinger, F. M. Wurm: *Biotechnol. Bioeng.* 87, 537–545 (2004)
- [29] O. Boussif, F. Lezoualc’h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J. P. Behr: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 7297–7301 (1995)
- [30] E. J. Schlaeger, K. Christensen: *Cytotechnology* 30, 71–83 (1999)
- [31] J. Logan, T. Shenk: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 3655–3659 (1984)
- [32] C. M. Gorman, D. Gies, G. McCray, M. Huang: *Virology* 171, 377–385 (1989)
- [33] G. W. G. Wilkinson, A. Akrigg: *Nucleic Acids Res.* 20, 2233–2239 (1992)
- [34] R. Klein, B. Ruttkowski, E. Knapp, B. Salmons, W. H. Gunzburg, C. Hohenadl: *Gene* 372, 153–161 (2006)
- [35] R. Zufferey, J. E. Donello, D. Trono, T. J. Hope: *J. Virol.* 73, 2886–2892 (1999)
- [36] M. De Angioletti, G. Lacerra, V. Sabato, C. Carestia: *Br. J. Haematol.* 124, 224–231 (2004)
- [37] M. Kozak: *Nucleic Acids Res.* 15, 8125–8148 (1987)
- [38] J. Lukas, C. Lukas, J. Bartek: *DNA Repair* 3, 997–1007 (2004)
- [39] M. B. Kastan, J. Bartek: *Nature* 432, 316–323 (2004)
- [40] Ricochet Creative Productions: <http://ricochetscience.com/brca1-cancer/>, aktuální ke dni 14. 1. 2014
- [41] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter: *Molecular Biology of the Cell*, 5. vyd. New York: Garland Science 2007, 1054–1055

-
- [42] H. Lodish, A. Berk, C. A. Kaiser, M. Krieger, A. Bretscher, H. Ploegh, A. Amon, M. P. Scott: *Molecular Cell Biology*, 7. vyd. New York: W. H. Freeman and Company 2011, 875
 - [43] D. O. Morgan: *Nature* 374, 131–134 (1994)
 - [44] E. A. Nigg: *BioEssays* 17, 471–480 (1995)
 - [45] R. A. Weinberg: *Cell* 81, 323–330 (1995)
 - [46] D. J. Lew, S. Kornbluth: *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 795–804 (1996)
 - [47] M. Peter, I. Herskowitz: *Cell* 79, 181–184 (1994)
 - [48] C. J. Sherr, J. M. Roberts: *Genes Dev.* 9, 1149–1163 (1995)
 - [49] Cell Signaling Technology: <http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=pathways-cc-g1s>, aktuální ke dni 14. 1. 2014
 - [50] C. A. Afshari, J. C. Barrett: *Cancer Res.* 54, 2317–2321 (1994)
 - [51] S. Kumar, X. Cheng, S. Klimasauskas, S. Mi, J. Pósfai, R. J. Roberts, G. G. Wilson: *Nucleic Acids Res.* 22, 1–10 (1994)
 - [52] J. X. Bi, J. Shuttleworth, M. Al-Rubeai: *Biotechnol. Bioeng.* 85, 741–749 (2004)
 - [53] A. V. Carvalhal, I. Marcelino, M. J. Carrondo: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 164–173 (2003)
 - [54] C. Dez, D. Tollervey: *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 631–637 (2004)
 - [55] X. Mazur, M. Fussenegger, W. A. Renner, J. E. Bailey: *Biotechnol. Prog.* 14, 705–713 (1998)
 - [56] A. Vazquez, E. E. Bond, A. J. Levine, G. L. Bond: *Nat. Rev. Drug. Discov.* 7, 979–987 (2008)
 - [57] K. F. Tacer, A. L. Bookout, X. Ding, H. Kurosu, G. B. John, L. Wang, R. Goetz, M. Mohammadi, M. Kuro-o, D. J. Mangelsdorf, S. A. Kliewer: *Mol. Endocrinol* 24, 2050–2064 (2010)
 - [58] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter: *Molecular Biology of the Cell*, 5. vyd. New York: Garland Science 2007, 1106
 - [59] K. Hong, J. Sherley, D. A. Lauffenburger: *Biomol. Eng.* 18, 185–192 (2001)
 - [60] M. Suzuki, K. Kasai, Y. Saeki: *J. Virol.* 80, 3293–3300 (2006)
 - [61] K. D. Robertson: *Oncogene* 20, 3139–3155 (2001)
 - [62] R. Lauster, T. A. Trautner, M. Noyer-Weidner: *J. Mol. Biol.* 206, 305–312 (1989)
 - [63] J. Pósfai, A. S. Bhagwat, R. J. Roberts: *Gene* 74, 261–265 (1988)
 - [64] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter: *Molecular Biology of the Cell*, 5. vyd. New York: Garland Science 2007, 467

-
- [65] A. P. Bird, A. P. Wolffe: *Cell* 99, 451–454 (1999)
 - [66] Z. Y. Chen, C. Y. He, L. Meuse, M. A. Kay: *Gene Ther.* 11, 856–864 (2004)
 - [67] L. Qin, Y. Ding, D. R. Pahud, E. Chang, M. J. Imperiale, J. S. Bromberg: *Hum. Gene Ther.* 8, 2019–2029 (1997)
 - [68] P. A. Marks, W. S. Xu: *J. Cell. Biochem.* 107, 600–608 (2009)
 - [69] S. Xu, J. Ren, H. B. Chen, Y. Wang, Q. Liu, R. Zhang, S. W. Jiang, J. Li: *Curr. Pharm. Des.* 20, 1881–1887 (2013)
 - [70] G. Lagger, D. O’Carroll, M. Rembold, H. Khier, J. Tischler, G. Weitzer, B. Schuettengruber, C. Hauser, R. Brunmeir, T. Jenuwein, C. Seiser: *EMBO J.* 21, 2672–2681 (2002)
 - [71] B. Schwartz, C. Avivi-Green, S. Polak-Charcon: *Mol. Cell. Biochem.* 188, 21–30 (1998)
 - [72] C. Buquet-Fagot, F. Lallemand, R. H. Charollais, J. Mester: *J. Cell. Physiol.* 166, 631–636 (1996)
 - [73] L. Nolan, P. W. Johnson, A. Ganesan, G. Packham, S. J. Crabb: *Br. J. Cancer* 99, 689–694 (2008)
 - [74] A. A. Lane, B. A. Chabner: *J. Clin. Oncol.* 27, 5459–5468 (2009)
 - [75] K. Sunley, M. Butler: *Biotechnol. Adv.* 28, 388 (2010)
 - [76] C. L. Rieder, R. W. Cole: *Cell Cycle* 1, 169–175 (2002)
 - [77] J. Fujita: *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1, 243–255 (1999)
 - [78] S. K. Yoon, J. Y. Song, G. M. Lee: *Biotechnol. Bioeng.* 82, 289–298 (2003)
 - [79] S. Oguchi, H. Saito, M. Tsukahara, H. Tsumura: *Cytotechnology* 52, 199–207 (2006)
 - [80] S. K. Yoon, S. L. Choi, J. Y. Song, G. M. Lee: *Biotechnol. Bioeng.* 89, 345–356 (2005)
 - [81] N. Arden, M. J. Betenbaugh: *Trends Biotechnol.* 22, 174–180 (2004)
 - [82] W. Flemming: *J. Cell. Biol.* 25, 3–69 (1965)
 - [83] J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie: *Br. J. Cancer* 26, 239–257 (1972)
 - [84] G. M. Cohen: *Biochem. J.* 326, 1–16 (1997)
 - [85] F. H. Igney, P. H. Krammer: *Nat. Rev. Cancer* 2, 277–288 (2002)
 - [86] A. Ashkenazi, V. M. Dixit: *Science* 281, 1305–1308 (1998)
 - [87] H. Hsu, J. Xiong, D. V. Goeddel: *Cell* 81, 495–504 (1995)
 - [88] F. C. Kischkel, S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P. H. Krammer, M. E. Peter: *EMBO J.* 14, 5579–5588 (1995)

-
- [89] BCI Lab Website: http://biochemoinformatics.unibo.it/bci/projects/Apoptosis_pathways2.png, aktuální ke dni 23. 1. 2014
- [90] Life Technologies: http://www.b2b.invitrogen.com/etc/medialib/en/images/ics_organized/applications/cell_tissue_analysis/data_diagram/750_wide.Par.54634.Image.750.750.1.s005662-TNF-pathway-gif.gif, aktuální ke dni 23. 1. 2014
- [91] X. Saelens, N. Fastjens, L. V. Walle, M. van Gurp, G. van Loo, P. Vandenabeele: *Oncogene* **23**, 2861–2874 (2004)
- [92] C. Du, M. Fang, Y. Li, L. Li, X. Wang: *Cell* **102**, 33–42 (2000)
- [93] L. M. Dejeans, S. Martinez-Caballero, S. Manon, K. W. Kinnally: *Biochim. Biophys. Acta* **1762**, 191–201 (2006)
- [94] M. Schuler, D. R. Green: *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 684–688 (2001)
- [95] M. M. Hill, C. Adrain, P. J. Duriez, E. M. Creagh, S. J. Martin: *EMBO J.* **23**, 2134–2145 (2004)
- [96] A. J. Mastrangelo, M. J. Betenbaugh: *Trends Biotechnol.* **16**, 88–95 (1998)
- [97] A. J. Mastrangelo, J. M. Hardwick, F. Bex, M. J. Betenbaugh: *Biotechnol. Bioeng.* **67**, 544–554 (2000)
- [98] G. G. Chiang, W. P. Sisk: *Biotechnol. Bioeng.* **91**, 779–792 (2005)
- [99] H. Meents, B. Enenkel, H. M. Eppenberger, R. G. Werner, M. Fussenegger: *Biotechnol. Bioeng.* **80**, 706–716 (2002)
- [100] M. Fussenegger, D. Fassnacht, R. Schwartz, J. A. Zanghi, M. Graf, J. E. Bailey, R. Pèortner: *Cytotechnology* **32**, 45–61 (2000)
- [101] O. Shimomura: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**, 5590–5602 (2009)
- [102] G. J. Phillips: *FEMS Microbiol. Lett.* **204**, 9–18 (2001)
- [103] F. G. Prendergast, K. G. Mann: *Biochemistry* **17**, 3448–3453 (1978)
- [104] M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, S. J. Remington: *Science* **273**, 1392–1395 (1996)
- [105] N. Budisa, P. P. Pal, S. Alefelder, P. Birle, T. Krywcun, M. Rubini, W. Wenger, J. H. Bae, T. Steiner: *Biol. Chem.* **385**, 191–202 (2004)
- [106] Carl Zeiss: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/jellyfishfps.html>, aktuální ke dni 27. 1. 2014
- [107] N. Baumgarth, M. Roederer: *J. Immunol. Methods* **243**, 77–97 (2000)
- [108] A. Mandal: <http://www.news-medical.net/health/Fluorescence-Activated-Cell-Sorting.aspx>, aktuální ke dni 27. 1. 2014
- [109] N. Atale, S. Gupta, U. C. Yadav, V. Rani: *J. Microsc.* **255**, 7–19 (2014)

-
- [110] J. Berger, J. Hauber, R. Hauber, R. Geiger, B. R. Cullen: *Gene* 66, 1–10 (1988)
- [111] B. R. Cullen, M. H. Malim: *Methods Enzymol.* 216, 362–368 (1992)
- [112] T. Yang, P. Sinai, P. A. Kitts, S. R. Kain: *Biotechniques* 23, 1110–1114 (1997)
- [113] D. R. Trentham, H. Gutfreund: *Biochem. J.* 106, 455–460 (1968)
- [114] E. Poláchová: bakalářská práce, Praha: PřF UK 2012
- [115] B. Lin, S. K. Kolluri, F. Lin, W. Liu, Y. H. Han, X. Cao, M. I. Dawson, J. C. Reed, X. K. Zhang: *Cell* 116, 527–540 (2004)
- [116] E. H. Cheng, D. G. Kirsch, R. J. Clem, R. Ravi, M. B. Kastan, A. Bedi, K. Ueno, J. M. Hardwick: *Science* 278, 1966–1968 (1997)
- [117] N. S. Wang, M. T. Unkila, E. Z. Reineks, C. W. Distelhorst: *J. Biol. Chem.* 276, 44117–44128 (2001)

[illegible]